

**KOMPLEMENTAKTIVE VERBINDUNGEN AUS
DER GRÜNLIPPIGEN MUSCHEL
PERNA CANALICULUS (GMELIN)
SOWIE
NIEDEREN UND HÖHEREN PFLANZEN**

ULLA KNAUS

Disbui. München
1989



**KOMPLEMENTAKTIVE VERBINDUNGEN AUS
DER GRÜNLIPPIGEN MUSCHEL
PERNA CANALICULUS (GMELIN)
SOWIE
NIEDEREN UND HÖHEREN PFLANZEN**

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Ulla Knaus
aus
München

März 1989

WILHELM VON HUMBOLDT UNIVERSITÄT BERLIN
FACHBEREICH GEWISSENSCHAFTEN
FACHBEREICH SPRACHWISSENSCHAFTEN
BERLIN
KUNST- UND MUSIKWISSENSCHAFTEN

VERGLEICHENDE LITERATURWISSENSCHAFT
UND
KUNST- UND MUSIKWISSENSCHAFT
VERGLEICHENDE LITERATURWISSENSCHAFT
UND
KUNST- UND MUSIKWISSENSCHAFT

1. Berichterstatter : Professor Dr. H. Wagner
 2. Berichterstatter : Professor Dr. J. Stöckigt
- Tag der mündlichen Prüfung : 23. 5. 1989

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A.	<u>Einleitung</u>	1
B.	<u>Interaktionen von Arzneipflanzen mit dem Komplementsystem</u> In-vitro-Untersuchungen über den Einfluß von Drogeninhalts- stoffen auf das Komplementsystem und seine Komponenten . . .	2
1.	Das Komplementsystem	2
1.1.	Die Rolle des Komplements im Immunsystem	2
1.1.1.	Verknüpfung des Komplementsystems mit anderen humoralen und zellulären Systemen des Körpers	3
1.1.2.	Einfluß des Komplements auf die Immunkomplexbildung	4
1.1.3.	Pathophysiologische Grundlagen von Krankheitsbildern, die mit dem Komplementsystem assoziiert sind	6
1.2.	Aufbau und Funktion des Komplementsystems	7
1.2.1.	Biosynthese	7
1.2.2.	Charakterisierung der Komplementkomponenten und Regulatorproteine	7
1.2.3.	Schematische Darstellung der Komplementkaskade	10
1.2.4.	Der Klassische Weg	10
1.2.5.	Die Erkennungseinheit C1	12
1.2.6.	Der Alternative Weg	12
1.2.7.	Die terminalen Komponenten und der "membrane attack complex (MAC)"	14
1.3.	Biologische Wirkungen der Komplementfragmente	14
2.	Entwicklung von in-vitro-Testsystemen zur Messung der Komplementaktivität	16
<i>A. Hämolytische Testsysteme zum Screening des Gesamtkomplements</i>		
2.1.	Grundlagen hämolytischer Testsysteme	17
2.1.1.	Einfluß der Reaktionsbedingungen	18
2.1.2.	Standardisierung der Erythrozyten	18
2.1.3.	Antikörpertitration	19

2.1.4.	Komplementtitration GP 1 / NHS 1	20
2.1.5.	Komplementtitration GP 2 / NHS 2	22
2.2.	Bestimmung der Komplementaktivität im Klassischen Weg des Komplementsystems (CP)	23
2.2.1.	Das Testsystem CP 1	23
2.2.2.	Das Testsystem CP 2	25
2.2.3.	Funktionelle Erfassung der Komplementkomponente C1	26
2.3.	Bestimmung der Komplementaktivität im Alternativen Weg des Komplementsystems (AP)	28
2.3.1.	Das Testsystem AP 1	28
2.3.2.	Das Testsystem AP 2	29
2.4.	Quantifizierung des Einflusses von Substanzen auf den Ablauf der Komplementkaskade	29
2.5.	Untersuchungen über mögliche Verfälschungen der Testergebnisse	30
2.5.1.	Kontaminationen	30
2.5.2.	Hämagglutination	31
2.5.3.	Chelatbildende Eigenschaften	32
2.5.4.	Lösungsmittel	32
2.5.5.	Drogenbegleitstoffe	33

*B. Immunchemische Methoden zum Screening einzelner Komplement-
komponenten*

2.6.	Nachweis der Aktivierung der Komponente C3 mit Immunelektro- phorese	33
2.7.	Nachweis der Aktivierung der Komponente C3 und des Faktors B mit Immunfixation	35
2.8.	Diskussion der Testsysteme	39
3.	Untersuchung von Drogeninhaltsstoffen auf Interaktionen mit dem Komplementsystem	40
3.1.	Kenntnisstand	41
3.2.	Niedermolekulare Drogeninhaltsstoffe	45
3.2.1.	Flavonoide	45
3.2.2.	Phenolcarbonsäuren	48
3.2.3.	Triterpene und Triterpensäuren	52
3.2.4.	Sesquiterpene	56

3.3.	Hochmolekulare Substanzen verschiedener Herkunft	57
3.3.1.	Sulfatierte Polysaccharide	57
3.3.2.	Neutrale Polysaccharide	63
3.3.3.	Uronsäurehaltige Polysaccharide	67
3.4.	Diskussion	71
3.4.1.	Diskussion der Screeningergebnisse	71
3.4.2.	Relevanz der in-vitro-Komplementaktivitäten für die Therapie. . . .	72
C.	<u>Perna canaliculus</u>	
	Chemische und pharmakologische Untersuchungen der neuseeländischen Muschel <i>Perna canaliculus</i> (Gmelin)	73
1.	Kenntnisstand über <i>Perna canaliculus</i>	73
1.1.	Pharmakologie und Anwendung in der Volksmedizin	73
1.2.	Systematik, Vorkommen und Beschreibung der Muschel	73
1.3.	Bisher bekannte Inhaltsstoffe	75
2.	Die Suche nach dem antiphlogistischen Wirkprinzip von <i>Perna canaliculus</i>	75
3.	"Bioguided fractionation" von <i>Perna</i>-Extrakten	76
3.1.	Ausgangsmaterialien	76
3.2.	Isolierung von Protein-Polysaccharid-Rohfraktionen	76
3.3.	Anionenaustauschchromatographie der Ammoniumsulfatfällungen	79
3.3.1.	Darstellung der Fraktion PeL2	79
3.3.2.	Komplementaktivität der neutralen und sauren Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie	82
3.4.	Gelfiltration der aktiven, sauren Fraktion PeL2	83
3.5.	Hydrophobe Interaktionschromatographie der aktiven, sauren Fraktion PeL2	84
3.6.	Strukturelle Charakterisierung des Glykoproteins PeL2	87
3.6.1.	Elementaranalysen	87
3.6.2.	Molekulargewichtsbestimmung	88
3.6.3.	Charakterisierung des Proteinanteils der Substanz PeL2	89
3.6.4.	Charakterisierung des Kohlehydratanteils der Substanz PeL2 . . .	90
3.6.5.	Methylierungsanalyse	91
3.7.	Pharmakologische Untersuchungen des Glykoproteins PeL2 . . .	95

3.7.1.	Antikomplementäre Wirkungen auf das Gesamtkomplement und Einzelkomponenten	95
3.7.2.	Hämagglutinationsteste mit PeL2	98
3.7.3.	Stimulierung der Lymphozytenproliferation durch PeL2	98
3.7.4.	Stimulierung des Tumor-Nekrose-Faktors durch PeL2	101
3.7.5.	Hemmung der Leukozyten-Elastase durch PeL2	101
3.7.6.	Beeinflussung der Blutgerinnungskaskade durch PeL2	102
3.7.7.	Überprüfung der Inhibierung pathophysiologisch wichtiger Enzyme mit PeL2	104
3.8.	Überprüfung verschiedener Perna canaliculus-Präparationen auf ihren komplementaktiven Glykoproteingehalt.	105
4.	Enzymatische Untersuchungen zweier verschiedener Chargen Perna canaliculus und Vergleich der Enzymaktivitäten mit Miesmuschel und Auster	107
4.1.	Glykohydrolytische Aktivität von Muschelextrakten	107
4.1.1.	Testmethodik	107
4.1.2.	Beschreibung des enzymatischen Testsystems	109
4.1.3.	Nachweis und quantitativer Vergleich glykohydrolytischer Aktivität in verschiedenen Muscheln	110
4.1.3.1.	β-D-Glucosidase-Aktivität	110
4.1.3.2.	α-L-Fucosidase-Aktivität	110
4.1.3.3.	β-D-Galaktosidase-Aktivität	111
4.1.3.4.	β-D-Xylosidase-Aktivität	111
4.1.3.5.	α-L-Arabinosidase-Aktivität	112
4.1.3.6.	β-D-Mannosidase-Aktivität	112
4.1.3.7.	β-D-Cellulase-Aktivität	113
4.1.3.8.	N-Acetyl-β-D-glucosaminidase-Aktivität	114
4.1.3.9.	N-Acetyl-β-D-galaktosaminidase-Aktivität	114
4.1.3.10.	β-D-Glucuronidase-Aktivität	115
4.1.3.11.	β-D-Galakturonidase-Aktivität	115
4.2.	Prüfung von Muschelextrakten auf Sulfatase-Aktivität	116
4.3.	Prüfung von Muschelextrakten auf proteolytische Aktivität	116
4.3.1.	Allgemeine Proteasenaktivität	116
4.3.2.	Bestimmung der Trypsin-Aktivität von Muschelextrakten	117
4.3.3.	Bestimmung der Papain-Aktivität von Muschelextrakten	118

5.	Versuche zur spezifischen und unspezifischen Hemmung von Glykohydrolasen	121
5.1.	Spezifische Enzymhemmung	121
5.2.	Unspezifische Enzymhemmung	122
5.2.1.	Hitzedenaturierung	122
5.2.2.	Versuche zur Verringerung der katalytischen Aktivität durch Temperaturemniedrigung	122
6.	Darstellung von Polysaccharidfraktionen aus vier verschiedenen Muschelextrakten	125
6.1.	Gewinnung von Polysaccharidfraktionen nach Papainhydrolyse und gleichzeitiger Enzyminhibition	125
6.2.	Chemische Charakterisierung der Polysaccharidfraktionen	127
7.	Chemische und pharmakologische Untersuchungen eines neutralen Glucans PeN1 aus dem Muschelextrakt Perna I	129
7.1.	Gewinnung des Glucans PeN1	129
7.2.	Strukturaufklärung des Glucans PeN1 und Identifizierung als Glykogen	132
7.2.1.	Chemische Zusammensetzung	132
7.2.2.	Fluoreszenzspektroskopie	132
7.2.3.	Methylierungsanalyse	133
7.2.4.	¹³ C - NMR - Spektroskopie	135
7.2.5.	Molekulargewichtsbestimmung	139
7.2.5.1.	Analytische Ultrazentrifugation	140
7.2.5.2.	Laser - Light - Scattering	142
7.3.	Pharmakologische Untersuchungen des Glykogens PeN1	144
7.3.1.	Antikomplementäre Wirkungen auf das Gesamtkomplement und Einzelkomponenten	144
7.3.2.	Stimulierung der Lymphozytenproliferation durch PeN1	146
7.3.3.	Phagozytoseaktivität des Glykogens PeN1 im Carbon-Clearance-Test	147
7.3.4.	Hemmung des Rattenpötenödems durch PeN1	148
8.	Diskussion der Pernauntersuchungsergebnisse	151
D.	<u>Zusammenfassung</u>	154



E.	<u>Experimenteller Teil</u>	159
1.	Herkunft der Muscheln und Testsubstanzen	159
1.1	Herkunft der Muschellyophilisate	159
1.2.	Herkunft der Testsubstanzen	160
2.	Pharmakologische Methoden	161
	<i>Pharmakologische Untersuchungen in vitro</i>	
2.1.	<u>Hämolytische Testsysteme zur Bestimmung der</u> <u>Gesamtkomplementaktivität</u>	161
2.1.1.	Geräte	161
2.1.2.	Reagenzien	161
2.1.3.	<u>Klassischer Weg</u>	162
2.1.3.1.	Puffer	162
2.1.3.2.	Gewinnung der Hammelerythrozyten (E-Zellen)	162
2.1.3.3.	Gewinnung der sensibilisierten Hammelerythrozyten (EA-Zellen)	163
2.1.3.4.	Standardisierung, Einstellung der Erythrozytenzahl	163
2.1.3.5.	Antikörpertitration	163
2.1.3.6.	Komplementtitration GP 1 / NHS 1	164
2.1.3.7.	Komplementtitration GP 2 / NHS 2	164
2.1.3.8.	Testsystem CP 1	165
2.1.3.9.	Testsystem CP 2	165
2.1.4.	<u>Alternativer Weg</u>	168
2.1.4.1.	Puffer	168
2.1.4.2.	Gewinnung von Kaninchenerythrozyten (E-Zellen)	168
2.1.4.3.	Standardisierung, Einstellung der Erythrozytenzahl	168
2.1.4.4.	Komplementtitration NHS	169
2.1.4.5.	Testsystem AP 1	169
2.1.4.6.	Testsystem AP 2	169
2.2.	<u>Testsysteme zur Bestimmung der Aktivität von Komplement-</u> <u>einzelkomponenten</u>	171
2.2.1.	Funktionelle Bestimmung der Komponente C1	171
2.2.2.	Immunelektrophorese für die Komponente C3	171
2.2.2.1.	Geräte	171
2.2.2.2.	Reagenzien	171
2.2.2.3.	Puffer	171

2.2.2.4.	Methodik	172
2.2.3.	Immunfixation für die Komponente C3.	172
2.2.3.1.	Geräte	172
2.2.3.2.	Reagenzien	172
2.2.3.3.	Puffer und Lösungen	172
2.2.3.4.	Methodik	173
2.2.4.	Immunfixation für Faktor B.	173
2.3.	Lymphozytentransformationstest	174
2.4.	Prüfung auf Stimulierung des Tumor-Nekrose-Faktors.	174
2.5.	Prüfung auf Beeinflussung der Leukozyten-Elastaseaktivität	174
2.6.	Prüfung auf Beeinflussung der Blutgerinnung	175

Pharmakologische Untersuchungen in vivo

2.6.	Carbon-Clearance-Test	175
2.7.	Hemmung des Rattenpfotenödems	176
3.	Chemische und physikalische Methoden	176
3.1.	<u>Allgemeine Arbeitsmethoden</u>	176
3.1.1.	Physikalisch - chemische Untersuchungen	176
3.1.1.1.	^{13}C - NMR - Spektroskopie	176
3.1.1.2.	IR - Spektroskopie	176
3.1.1.3.	UV - Spektroskopie	176
3.1.1.4.	Fluoreszenzspektroskopie	177
3.1.1.5.	Optische Drehung	177
3.1.1.6.	Analytische Ultrazentrifugation	177
3.1.1.7.	Laser - Light - Scattering	178
3.1.1.8.	Gaschromatographie	178
3.1.1.9.	Gaschromatographie - Massenspektrometrie.	179
3.1.2.	Chromatographische Methoden	179
3.1.2.1.	Dünnschichtchromatographie	179
3.1.2.2.	Säulenchromatographie	180
3.1.2.3.	Ionenchromatographie (IC)	180
3.1.2.4.	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	181
3.1.2.5.	Gelpermeationschromatographie	182

3.1.3.	Molekulargewichtsbestimmung	182
3.1.3.1.	HPLC-Gelpermeationschromatographie	182
3.1.3.2.	Gelfiltration	183
3.1.4.	Proteinbestimmung	183
3.1.5.	Neutralsukkerbestimmung	184
3.1.5.1.	Quantifizierung des Gesamtkohlehydratanteils mittels Anthrontest	184
3.1.5.2.	Quantitative Bestimmung der Einzelzucker	184
3.1.6.	Uronsäurebestimmung	184
3.1.7.	Aminozuckerbestimmung	184
3.1.8.	Schmelzpunkt	185
3.1.9.	Dialyse	185
3.2.	<u>Spezielle Arbeitsmethoden</u>	186
3.2.1.	Extraktion hochmolekularer Inhaltsstoffe aus Pernaextrakt.	186
3.2.2.	Ammoniumsulfatfällungen (PeAF1, PeAF2)	186
3.2.3.	Isolierung des Glykoproteins durch Anionenaustausch- chromatographie (PeL2).	186
3.2.4.	Reinigung des Glykoproteins durch Gelfiltration (PeL2)	187
3.2.5.	Hydrophobe Interaktionschromatographie des Glykoproteins (PeL2)	187
3.2.6.	Isolierung saurer hochmolekularer Substanzen über Cetylpyridiniumfällungen	188
3.2.7.	Anionenaustauschchromatographie mit dem Batchverfahren bei erniedrigter Temperatur	188
3.2.8.	Isolierung von Polysacchariden aus Muschelextrakt nach Papainabbau	189
3.2.9.	Anionenaustauschchromatographie des Muschelextrakts Perna l nach Hitzedenaturierung	189
3.2.10.	Hydrolysebedingungen für Polysaccharide	190
3.2.11.	Darstellung der Alditolacetate	190
3.2.12.	Acetylierung von Polysacchariden	190
3.2.13.	Darstellung der methylierten Alditolacetate	191
3.2.14.	Darstellung von N-Acetylglucosaminonolacton	192

4.	Enzymatische Methoden	193
4.1.	Bestimmung der glykohydrolytischen Aktivität	193
4.1.1.	Spektrophotometrische Bestimmung	193
4.1.1.1.	Material und Geräte	193
4.1.1.2.	Methodik	193
4.1.1.3.	Auswertung	194
4.1.2.	Qualitativer Nachweis der Cellulase-Aktivität mit Dünnschichtchromatographie	194
4.2.	Überprüfung der sulfatabspaltenden Aktivität.	194
4.3.	Überprüfung der proteolytischen Aktivität	195
4.3.1.	Unspezifischer Proteasennachweis mit Azocoll.	195
4.3.2.	Bestimmung der Trypsin-Aktivität	195
4.3.3.	Bestimmung der Papain-Aktivität	196
F.	<u>Literatur</u>	197

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AK	Antikörper
AP	Alternativer Weg (alternative pathway)
BSA	Rinderserumalbumin
C1-9	einzelne Komplementkomponenten
C1, C4b2a	aktivierte Komplementkomponenten
C1-INH	aktivierter Inhibitor der Komponente C1
C3a, C4a, C5a	Bruchstücke der Komplementkomponenten C3-5
CON A	Concanavalin A
CP	Klassischer Weg (classical pathway)
cpm	Zählimpulse/Minute (counts per minute)
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
E-Wert	Absorption einer Lösung bei 412 nm
E-Zellen	Erythrozyten
EA-Zellen	mit Antikörper beladene Erythrozyten
EAC4b	mit dem Bruchstück C4b beladene EA-Zellen
ε	molarer Absorptionskoeffizient
Faktor B	Komplementkomponente Faktor B des Alternativen Weges
GP	Meerschweinchen Serum (guinea pig serum)
Hu	Human
iC4	inaktivierte Komplementkomponente C4
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	terminaler Komplex der Komplementkomponenten C5b-9 (membrane attack complex)
MG	Molekulargewicht
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
NHS	Humanes Serum ohne C-Defizienz (normal human serum)
NK-Wert	Absorption einer Lösung bei 412 nm nach Zugabe von Erythrozyten
n.b.	nicht bekannt
n.t.	nicht getestet
Pe	Perna
PK-Wert	Absorption einer Lösung bei 412 nm nach Zugabe von Erythrozyten und Komplement
PS	Polysaccharid
RT	Raumtemperatur
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TFN-α	Tumor-Nekrose-Faktor
VBS	Veronal buffered saline

A. Einleitung

Pharmakologische Untersuchungen, die in den letzten Jahren in unserem Arbeitskreis mit Hilfe von in-vitro- und in-vivo-Screeningmodellen durchgeführt wurden, haben zur Auffindung einer Reihe von Pflanzeninhaltsstoffen mit immunmodulierender bzw. antiphlogistischer Wirkung geführt.

In der Palette der bisher eingesetzten Screening-Methoden fehlten aber geeignete Testsysteme, um auch inhibierende oder aktivierende Einflüsse von Verbindungen aus Pflanzen auf das **Komplementsystem** zu testen. Dieser Teil der unspezifischen Immunabwehr spielt eine wichtige Rolle bei bestimmten Autoimmunkrankheiten, bei Polyarthritis und anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Seit einigen Jahren mehren sich in der Literatur auch Hinweise auf das Vorliegen komplementaktiver Naturstoffe im Pflanzen- und Tierreich.

Die vorliegende Arbeit hatte daher das Ziel, entsprechende in-vitro-Modelle für beide Wege der Komplementkaskade (Klassischer und Alternativer Weg) zu etablieren, die Verwendbarkeit dieser Testsysteme für das Screening von Naturstoffen zu prüfen und sie bei der Suche nach potentiellen Komplementinhibitoren oder -aktivatoren in Pflanzen und Tieren einzusetzen.

Bei besonders aktiven Verbindungen sollte außerdem versucht werden, den Wirkmechanismus und den Angriffspunkt an der Komplementkaskade genauer zu charakterisieren.

Neben einem systematischen Screening in der Klasse niederer und höherer Pflanzen sollte vor allem die aus den Meeren Neuseelands stammende grünlippige Muschel **Perna canaliculus** (Gmelin) eingehend chemisch und pharmakologisch untersucht werden, da Trockenextrakte dieser Muschel in der Volksmedizin seit längerem zur adjuvanten Rheumatherapie eingesetzt werden. Als möglicher Wirkmechanismus für die auch in klinischen Studien nachgewiesenen positiven Effekte wird die Beeinflussung der am Entzündungsgeschehen beteiligten Immunreaktionen diskutiert.

B. Interaktionen von Arzneipflanzen mit dem Komplementsystem

In-vitro-Untersuchungen über den Einfluß von Drogeninhaltsstoffen auf das Komplementsystem und seine Komponenten

1. Das Komplementsystem

1.1. Die Rolle des Komplements im Immunsystem

Das menschliche Immunsystem kann in ein **spezifisches**, aktiv erworbenes und in ein **unspezifisches**, durch Geburt erhaltenes Abwehrsystem unterteilt werden. Beide Formen wiederum bestehen formal aus einem **humoralen** und einem **zellulären** Teil. Die spezifische humorale Abwehr ist durch Antikörperproduktion (IgM, IgG, IgA) gekennzeichnet. Spezifische T-Lymphozytenpopulationen (Helfer T-, Suppressor T-, zytotoxische T-Zellen) stellen dagegen die zelluläre Komponente dar. Zu den humoralen Faktoren der unspezifischen Resistenz gehören u.a. das Komplementsystem, Lysozyme, Interferone und Akute-Phase-Proteine, während hier die zelluläre Immunität von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, den Zellen des mononukleärphagozytären Systems und den natürlichen Killerzellen getragen wird. Spezifische wie unspezifische Abwehrvorgänge sind von gleichgroßer Bedeutung, und erst durch ihre Verflechtung wird eine wirkungsvolle Abwehr aufgebaut. Aus dieser Verflechtung resultiert meist eine Amplifikation der Reaktion, wie beispielsweise die spezifische Antigen-Antikörper Reaktion und ein ihr nachfolgender unspezifischer Verstärkermechanismus durch das Komplementsystem.

Das Komplementsystem stellt eine zentrale Schaltstelle innerhalb des Immunsystems dar, wobei seine Funktionen weit über die Vermittlung der Antigeneliminierung hinausgehen. Dieses Konzept ergab sich aus Beobachtungen, wonach fast alle immunkompetenten Zellen Rezeptoren für verschiedene Komplementkomponenten bzw. -fragmente tragen.

Eine Aufstellung heute bekannter oder vermuteter Rezeptortypen findet sich in Tab. 1 (SIM *et al.* 1986, DIERICH *et al.* 1986, ROSS *et al.* 1987).

Tab. 1 : Membrangebundene Moleküle, die als Rezeptoren für Fragmente aktivierter Komponenten dienen :

Rezeptortyp	geb. Fragment	beteiligte Zelltypen
C1qR	C1q	B-Lymphozyten, Monozyten, Plättchen, einige T-Zelllinien, Makrophagen
CR ₁	C4b, C3b	Monozyten, B-Lymphozyten, einige T-Zelllinien, Erythrozyten, Granulozyten
CR ₂	C3d, iC3b, C3dg	B-Lymphozyten, lymphozyt. Leukämiezellen
CR ₃	iC3b, iC3, β -Glucan, Zymosan	Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NK)
CR ₄	C3dg, C3d	Monozyten, polymorphkernige Zellen
MCP (gp 45-70)	C3b, C4b	Monozyten, T-Lymphozyten, Plättchen, Reticulozyten
C3aR, C4aR	C3a, C4a	Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen
C5aR	C5a	

Weitere Rezeptortypen : DAF (decay accelerating factor)
p 150,95
Oberflächenfaktor H
HSV 1c Glykoprotein

1.1.1. Verknüpfung des Komplementsystems mit anderen humoralen und zellulären Systemen des Körpers

Über diese Rezeptoren können Komplement (C)-Fragmente eine Reihe von zellulären Antworten induzieren. Zum Beispiel wird durch C3-Bruchstücke die Antikörperproduktion oder durch eine Bindung an C1q die Lymphokinbildung reguliert (VORLAENDER 1983). Das Zusammenspiel der Komplementkomponenten und ihrer Abbauprodukte mit der spezifischen Körperabwehr ergibt sich aus der engen Verbindung zu T-Lymphozyten und dem Einfluß auf Proliferation und Differenzierung der B-Lymphozyten (DIERICH *et al.* 1986).

Der Bezug zu der unspezifischen zellulären Immunantwort wird durch die hohe Anzahl von Komplementrezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen gegeben, den wichtigsten, nicht lymphoiden Effektorzellen in Infekt- und Tumorabwehr, und durch ihr Vermögen, ihrerseits eine Vielzahl von Komplementfaktoren zu sezernieren. Die aktivierten Makrophagen stellen neben ihrer Phagozytosefunktion hochaktive sekretorische Zellen dar, die eine Reihe von Enzymen und Faktoren in das umgebende Medium freisetzen (Komplementfaktoren, Cathepsine, Kollagenase, Elastase, Plasminogenaktivator, Arachidonsäurederivate wie LTB_4 , CSF, LAF, IL-1, Interferone, TNF) (WEIR *et al.* 1984).

Darüber hinaus gibt es enge Querverbindungen des Komplementsystems mit dem Blutgerinnungssystem und dem Kininsystem (Abb. 1) (AUSTEN *et al.* 1974).

Eine zentrale Stellung nimmt der Hageman Faktor ein, der bei Zellschaden generiert wird, und der sowohl Gerinnung wie Fibrinolyse einleitet und das Kininsystem aktiviert. Die Verknüpfung zwischen den Systemen erfolgt durch das Plasmin und den C $\bar{\text{T}}$ -Inhibitor (C $\bar{\text{T}}$ -INH).

1.1.2. Einfluß des Komplements auf die Immunkomplexbildung

Bei der Interaktion von Antikörpern mit Antigenen kann wegen der Bivalenz der IgG bzw. der Multivalenz der IgM Antikörper ein großes Gitter untereinander verbundener Moleküle gebildet werden. Die Art des Komplexes und seine Ausscheidungskinetik sind von dem Verhältnis Antigen/Antikörper abhängig. Eine zentrale Position nimmt das Komplement im Immunkomplexgeschehen ein. Der Klassische Aktivierungsweg des Komplementsystems spielt sowohl eine wichtige Rolle in der Verhütung von Bildung und Präzipitation großer Immunkomplexe während der ersten Stufen der AgAk-Interaktion (SCHIFFERLI 1986) als auch in der Auslösung pathophysiologischer Reaktionen durch seine Spaltprodukte. Währenddessen können über den Alternativen Weg schon formierte Komplexe solubilisiert werden (MILLER *et al.* 1975). Genetisch determinierte oder pathologisch erworbene, erniedrigte Komplementkomponenten- oder Komplementrezeptorenlevel verhindern dabei die Formation bzw. Clearance von Immunkomplexen. Diese in der Zirkulation verbleibenden oder abgelagerten Immunkomplexe lösen über Mediatorfreisetzungen generalisierte pathologische Reaktionen oder lokale Gewebsschädigungen bis zur Nekrose aus.

1.1.3. Pathophysiologische Grundlagen von Krankheitsbildern, die mit dem Komplementsystem assoziiert sind

Bei vielen Krankheitsbildern ist die Frage, ob die Komplementreaktion die auslösende Ursache für die Manifestation oder Symptomatik der Krankheit darstellt oder lediglich mitbeteiligt ist, nicht geklärt.

Ausgehend vom Immunkomplexgeschehen verstärkt das Komplementsystem bei der Arthusreaktion, einer allergischen Sofortreaktion mit lokaler intravasaler Antigen-Antikörper Komplexbildung und Ablagerung dieser im Gewebe, die bis zur Nekrose fortschreitende entzündliche Gefäßreaktion (PSCHYREMBEL 1986). Je nach Ablagerungsort treten verschiedene Krankheitsbilder wie Glomerulonephritis, systemischer Lupus erythematodes (SLE), chronische Polyarthritis (c.P.), extrinsische allergische Alveolitis oder - als generalisiertes Bild - die Serumkrankheit auf.

Eine Vielzahl von Untersuchungen weisen daraufhin, daß das Krankheitsbild der chronischen Polyarthritis ebenfalls eng mit dem Komplementsystem assoziiert ist. Bei 55-75 % der c.P.-Patienten konnte eine stark erhöhte Anzahl C1q tragender Immunkomplexe im Serum und in der Synovialflüssigkeit detektiert werden (ANTES *et al.* 1988, VERSEY *et al.* 1973).

Demgegenüber scheint bei der sogenannten aktivierten Arthrose die Abnahme des C3-Titers statt immunkomplexvermittelt über C1q über den Alternativen Weg des Komplementsystems abzulaufen (STOJAN 1983).

Eine pathologische Komplementaktivierung über beide Wege des Systems mit erniedrigten Komplementspiegeln und massivem Auftreten von C3-Spaltprodukten wurde auch bei Patienten mit ARC (Aids-related complex) oder LAS (Lymphadenopathiesyndrom) festgestellt. Ein Zusammenhang mit der Höhe des HIV-Titers konnte nicht gefunden werden, wie auch die genauere Rolle des Komplements in diesem Immundefekt noch nicht geklärt ist (PERRICONE *et al.* 1987).

1.2. Aufbau und Funktion des Komplementsystems

Das lateinische Wort "complementum" bedeutet Ergänzung, Vervollständigung. Es wird heute für die Gesamtheit bestimmter im Serum vorkommender Proteine verwendet, die in einer festgelegten Reihenfolge nacheinander reagieren, wenn ein adäquater auslösender Reiz vorhanden ist, und so die eingeleitete Reaktion vervollständigen.

1.2.1. Biosynthese

Unter den Plasmaproteinen haben die Komplementkomponenten die höchste Umsatzrate; bis zu 50 % werden täglich erneuert. Ihren Hauptsyntheseort stellt die Leber dar. Daneben können die Zellen des mononukleär phagozytierenden Systems, Makrophagen (C2, C4), die Milz (C1q) und intestinale Epithelzellen (C1) biosynthetisch aktiv werden (WHALEY 1986). Die Plasmaspiegel variieren innerhalb der einzelnen Komponenten sehr stark (0,001 mg/ml Faktor D bis 1,3 mg/ml C3). Bei gewissen komplementassoziierten Krankheiten steigt der Verbrauch einiger Komponenten drastisch an, wobei jedoch der Körper dies durch eine erhöhte Syntheserate zu kompensieren versucht.

1.2.2. Charakterisierung der Komplementkomponenten und Regulatorproteine

Unter dem Begriff Komplement werden ca. 20 Proteine und Glykoproteine des Serums zusammengefaßt. Inbegriffen sind dabei die zahlreichen Regulatorproteine, die aus physiologisch orientierter Sicht unbedingt in dieses System einbezogen werden müssen, da sich sonst kein steuer- oder regulierbares System ergeben würde. Zum Komplement im weiteren Sinne werden auch zellständige Membranoberflächenrezeptoren für C-Bruchstücke oder Abbauprodukte (Tab. 1) hinzugerechnet. Der Hauptteil der als Enzyme oder Bindungsproteine fungierenden Komponenten liegt im Serum in proenzymatischer Form vor. Die Aktivierung erfolgt meist durch Abspaltung von Polypeptidketten, wobei das größere Fragment weiter an der Reaktion teilnehmen kann, während das kleinere im umgebenden Medium biologische Funktionen ausübt oder inaktiviert wird (Abb. 2, Abb. 3).

Abb. 2 : Plasmaproteine, die an der Aktivierung des Komplementsystems beteiligt sind

Komplement- komponente	MG (kD)	Plasmakonz. (µg/ml)	aktive C-Fragmente oder Reaktionseinheiten	Abbauprodukte
<u>Klassischer Weg</u>				
C1q	462	80		
C1r	83	50	C1q + C1r ₂ S ₂	
C1s	83	50		
C4	205	600	C4a, C4b	C4a desarg, C4d, C4c
C2	102	20	C2a	C2b
C3	185	1300	C3a, C3b	C3a desarg, iC3b → C3dg, C3d, C3f, ∞ C3c, C3g, C3e, C3dk
<u>Alternativer Weg</u>				
Faktor D	24	1		
Faktor B	92	210	Bb	Ba
C3	185	1300	C3a, C3b	siehe C3 Klassisch
<u>Endkomponenten</u>				
C5	190	70	C5a, C5b	C5a desarg
C6	120	64		
C7	110	56		
C8	150	55	C5b + C6-9 (MAC)	
C9	71	59		

Abb. 3 : Plasmaproteine, die eine Kontrollfunktion im Komplementsystem ausüben

Protein	MG (kD)	Plasmakonz. (µg/ml)	Spezifität für Fragmente	Funktion
C1-INH	110	200	C1r, C1s	Formt aus C1r und C1s einen 1:1 Komplex und entfernt diesen aus dem C1-Komplex. Inhibiert Plasmin, Kalikrein und aktiviert den Hagemanfaktor.
C4bp	500	250	C4b	Beschleunigt den Zerfall der C3-Konvertase C4b2a; Cofaktor von Faktor I.
Faktor H	150	480	C3b	Beschleunigt den Zerfall der C3-Konvertase C3bBb; Cofaktor von Faktor I.
Faktor I	88	35	C3b, C4b	Inaktiviert C4b und C3b.
Anaphylatoxin-Inaktivator	310	35	C3a, C4a, C5a	Carboxypeptidase, die die drei Anaphylatoxine durch Abspaltung des endständigen Argininrestes inaktiviert.
S-Protein	83	505	C5b-9	Bis zu drei Moleküle dieses Proteins binden sich an C5b-9 und verhindern so die Bindung an Zelloberflächen.
Properdin	220	20	C3bBb	Stabilisiert die C3/C5-Konvertase des Alternativen Weges.
DAF	70	0,06	C4b2a, C3bBb	Beschleunigt den Zerfall der beiden C3-Konvertasen; kommt eher membrangebunden als im Plasma vor.

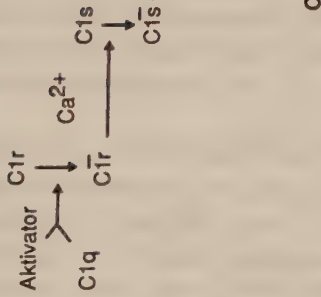
1.2.3. Schematische Darstellung der Komplementkaskade

Das menschliche Komplementsystem kann über zwei Hauptwege aktiviert werden, den **Klassischen** und den **Alternativen Weg**. Beide Wege laufen ab der zentralen Komponente C3 parallel und resultieren in der gleichen Angriffseinheit C5b-9. Der kaskadenartige Verlauf zeigt deutliche Bezüge zum Blutgerinnungssystem (Abb. 4).

1.2.4. Der Klassische Weg

Der Klassische Aktivierungsweg stellt ein Beispiel für die Kopplung zwischen humoraler spezifischer und unspezifischer Immunabwehr dar. Bei der Bindung eines Immunglobulins der IgM oder IgG Klasse an ein Antigen unterliegt der Antikörper einer Konformationsänderung an seinem Fc-Teil. Dadurch wandelt sich dieser Ig-Teil zu einer Bindungsstelle für die C1q Untereinheit der ersten Komplementkomponente C1. Eine stabile Bindung mit darauf einsetzender Komplementreaktion wird mit einem Molekül IgM bzw. zwei Molekülen IgG ermöglicht. Durch diese Reaktion werden mittels Abspaltungen zunächst C1r, dann C1s aktiviert. Das enzymatisch aktive C1s spaltet C4 in C4a und in das größere Bruchstück $\overline{\text{C4b}}$, welches sich kovalent in der Nähe von C1 an die Membran bindet. An dieses Fragment lagert sich in Gegenwart von Magnesium natives C2 an, woraufhin wiederum eine Spaltung in zwei Bruchstücke erfolgt. Es entsteht ein Komplex $\overline{\text{C4b2a}}$, genannt C3-Konvertase, die in ihrer Funktion nicht mehr auf C1 angewiesen ist und eine Vielzahl von C3 Molekülen in C3a und C3b spalten kann. Zur Fortsetzung der Kaskadenreaktion muß sich das Bruchstück $\overline{\text{C3b}}$ in kürzester Zeit an eine Membranoberfläche kovalent binden, um von nativem C5 das kleine Fragment C5a abzuspalten. Die Teilkomponente C5b ist Ausgangspunkt für den "membrane attack complex" (B.1.2.7.) (HADDING 1980).

Klassischer Weg



Alternativer Weg

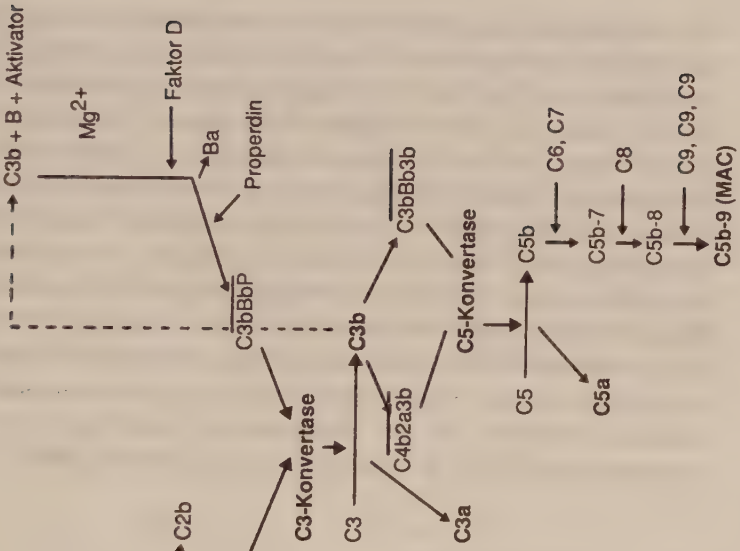


Abb. 4: Aktivierungswege des Komplementsystems

1.2.5. Die Erkennungseinheit C1

Die Komplementkomponente C1 stellt einen trimolekularen Komplex dreier Proteine dar, die mit Hilfe von Calcium zusammengehalten werden ($C1qC1r_2C1s_2$). Der Mechanismus der nach der C1q Bindung folgenden intramolekularen Spaltung der zwei C1r Ketten ist noch nicht geklärt. Das aktivierte C1r spaltet die zwei C1s Ketten, worauf die weiteren Aktivierungsreaktionen stattfinden können. Diese Startfunktion des Klassischen Weges wird durch den C1-Inhibitor reguliert, der nach Bindung an aktiviertes C1r und C1s deren Dissoziation aus dem Komplex erhöht.

Untersuchungen der letzten Jahre konnten die These der reinen immunkomplexabhängigen Aktivierung des Klassischen Weges widerlegen. So wurde eine Reihe von Substanzen gefunden, die C1q binden können, wobei eine Bindung eine Aktivierung oder eine Inhibierung der Folgereaktionen bedeuten kann. Zu diesen "Aktivatoren" zählen RNA-Tumoviren, einige Parasiten, Lipid A, das C-reaktive Protein (CRP) und multimeren Substanzen aus sich wiederholenden Untereinheiten wie polyionische Kohlenhydrate (SÖLTER *et al.* 1982, COOPER 1983, LAW *et al.* 1988).

1.2.6. Der Alternative Weg

Das Serumglykoprotein Properdin, durch PILLEMER 1954 erstmalig beschrieben, diente lange unter der Bezeichnung Properdinsystem als Synonym für den zweiten Weg des Komplementsystems, der heute Alternativer Weg genannt wird.

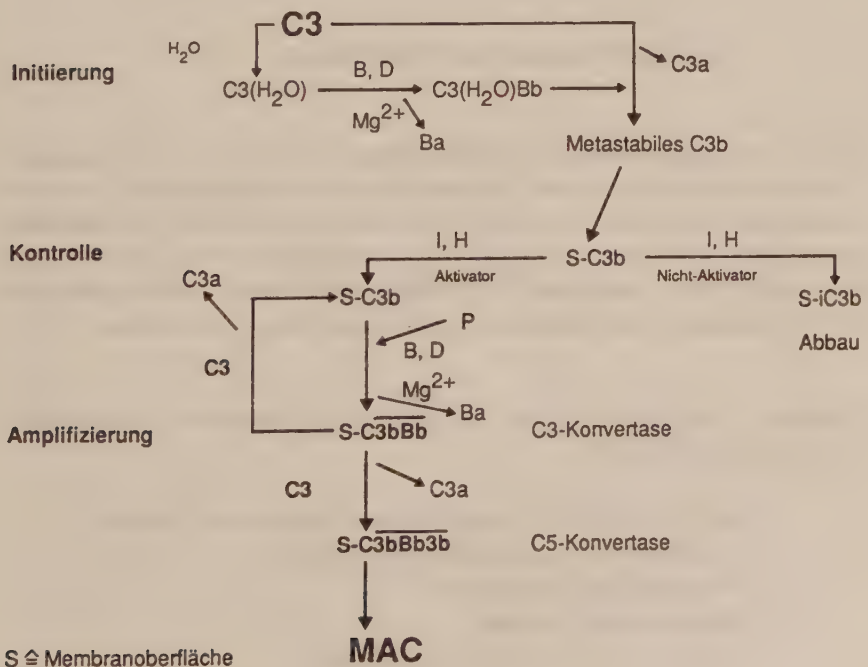
Seine Aktivierung repräsentiert ein Mittel der natürlichen Resistenz gegen infektiöse Agentien, da eine große Anzahl potentiell pathogener Stoffe auch in Abwesenheit von Antikörpern neutralisiert werden kann. Damit besitzt der Organismus einen sofort verfügbaren Schutzmechanismus, der ein humorales Äquivalent zu den NK-Zellen darstellt.

Im Gegensatz zum Klassischen Weg sind für den Alternativen Weg schon seit längerer Zeit eine Reihe von Substanzen bekannt, die aktivierende Eigenschaften besitzen. Dazu zählen z.B. Bakterien, Viren, Parasiten, Tumorzellen, $Ig(ab)_2$ -Komplexe, Cobra Venom Factor, LPS, Zymosan, Polysaccharide wie Inulin, Agarose und polyanionische Verbindungen (PANGBURN 1983). Die Aktivierung erfolgt entweder durch Bindung des metastabilen C3b, bevor ein Angriff der systemeigenen Inhibitoren stattfinden kann, oder durch Entzug dieser Inhibitoren mittels Komplexbildung (HADDING 1980).

Der Alternative Weg besteht aus sechs Proteinen, wobei die Komponenten C3b, Faktor B und Faktor D der Initiierung und die Faktoren H und I, neben Properdin, der Kontrolle der Reaktion dienen (Abb. 5, PANGBURN 1983).

Die Erstinitiierung erfolgt über spontane Hydrolyse des ungebundenen Plasma-C3. Dieses besitzt wie auch das später gebildete C3b die Fähigkeit, in Gegenwart von Magnesium den Faktor B zu binden. Im nächsten Schritt spaltet die Serinprotease Faktor D das gebundene B in Ba und Bb. Die Serinprotease Bb kann natives C3 in C3a und metastabiles C3b spalten, welches unter dem Einfluß von Aktivatoren in einer positiven Rückkopplungsreaktion wiederum mit den Faktoren B und D reagiert. Durch die Bindung von Properdin wird die Stabilität dieser C3-Konvertase um das Zehnfache gesteigert und die Anzahl bindungsfähiger C3b-Bruchstücke enorm erhöht. Nach der Bildung der C5-Konvertase münden der Alternative und der Klassische Weg in die gemeinsame Sequenz C5b-9. Regulatorfunktionen üben im Alternativen Weg Faktor H durch Bindung an C3b und Faktor I durch Degradation des nun inaktiven C3b aus.

Abb. 5: Alternativer Weg



1.2.7. Die terminalen Komponenten und der "membrane attack complex (MAC)"

Alle Sequenzen der Komplementkaskade, die sich an das oberflächengebundene C5b anschließen, sind nicht mehr enzymatischer Natur, sondern durch hydrophobe Wechselwirkungen gekennzeichnet. Mit den Komponenten C6 und C7 wird ein trimolekularer Komplex gebildet, der sich eng an den Lipidteil der Membran anschließt. Durch die Mobilisierung von C8 findet ein erstes Eindringen in die Membran statt. Für die Ausbildung eines transmembranen Kanals sind dann mindestens drei Moleküle C9 nötig, worauf eine osmotische Zellyse folgt (MÜLLER-EBERHARD 1978). Diese Lyse findet sehr leicht bei Erythrozyten und gramnegativen Bakterien statt, während kernhaltige Zellen, wie Leukozyten und Tumorzellen, durch ihr Membranreparatursystem viele Kanäle benötigen. Grampositive Bakterien besitzen keine äußere Membran, jedoch eine sehr dicke Peptidoglykanschicht. Sie sind deshalb nicht zytolytisch zerstörbar, werden aber mit Hilfe von gebundenem C3b leichter phagozytiert (SCHWEINLE *et al.* 1988).

1.3. Biologische Wirkungen der Komplementfragmente

Bei der Aktivierung der frühen Komplementkomponenten C1-C5 werden Polypeptide vom nativen Molekül abgespalten. Vor allem den kleinen Fragmenten C5a, C3a und C4a kommt eine wichtige Rolle als Entzündungsmediatoren zu. Diese auch **Anaphylatoxine** genannten Peptide wirken in einer Konzentration von 10^{-6} - 10^{-9} M. Ihre Wirkung wird durch Inaktivierung mittels einer Carboxypeptidase lokal begrenzt. Sie ist nie systemisch wie die Wirkung der an Mastzellen gebundenen IgE-Antikörper.

Folgende biologischen Leistungen sind auf diese Spaltprodukte zurückführbar: (MORGAN 1986, VOGT 1986)

- Freisetzung vasoaktiver Amine wie Histamin, Serotonin aus Mastzellen
- Freisetzung lysosomaler Enzyme aus Neutrophilen
- Erhöhung der Gefäßpermeabilität
- Kontraktion glatter Muskulatur
- Chemotaxis von Granulozyten und Makrophagen

Daneben stellen C5a und C3a Gegenspieler in ihrem Einfluß auf die Immunantwort dar. C5a stimuliert die Produktion von IL-1 und erhöht sowohl die Antigen vermittelte T-Zellproliferation wie auch die T-zellabhängige Antikörpersekretion. Dagegen unterdrückt C3a die Antikörperproduktion und induziert eine nicht spezifische T-Suppressorwirkung.

Die größeren Spaltprodukte wie C3b und C4b, sowie Abbauprodukte von iC3b entfalten ihre biologischen Wirkungen durch ihre Membranbindungsfähigkeit. Sie dienen der Abwehr von Tumorzellen und Erregern aller Art. Über ihre Bindung vermitteln sie biologische Wirkungen wie Immunadhärenz und Opsonisierung, Steigerung der Phagozytose, Neutralisation und Zytolyse.

2. Entwicklung von in-vitro-Testsystemen zur Messung der Komplementaktivität

In-vitro-Meßmethoden der Komplementaktivität basieren entweder auf der Funktion oder auf der Proteinstruktur des Komplements (VORLÄNDER 1984, SUN *et al.* 1986, COOPER *et al.* 1984)

A. Funktionelle Testmethoden (hämolysische Titrationen)

- Gesamtkomplementtitrationen (TCH_{50} , ACH_{50})
- Molekultitrationen von C1, C2, C4
- Titerbestimmungen von C3, C5-C9
- C1-INH Bestimmung über Messung freigesetzten Wasserstoffs oder über Plasmakallikreinaktivierung

B. Immunchemische Bestimmungsmethoden

- Einfache radiale Immundiffusion nach Mancini
- Immunelektrophorese IE
- zweidimensionale IE, Rocket IE, Counter IE
- Immunfixation
- Nephelometrie

C. Bindungsversuche mittels ELISA oder RIA für Gesamtkomplement oder Einzelkomponenten

D. Immunfluoreszenz gewebefixierter Komponenten

Dabei kann man weiter zwischen der Bestimmung des Gesamtkomplements oder seiner Einzelkomponenten differenzieren. Über die funktionelle Gesamtkomplementtitration erhält man relativ schnell und einfach eine Orientierung über den Zustand des Systems, wobei jedoch die Summe der Aktivitäten aller Einzelkomponenten und natürlicher Inaktivatoren zusammen bestimmt wird. Dadurch wird die Beurteilung geringer quantitativer Veränderungen an Überschußkomponenten wie C3 oder auch von Ereignissen, die auf dem Zusammenspiel mehrerer Komplementbestandteile beruhen, erschwert (ROTHER *et al.* 1974).

Detaillierteren Einblick erlauben die Messungen von Einzelkomponenten sowohl mit hämolysischen wie immunchemischen Testsystemen. Dabei ist die Molekultitration, mit der die Aktivität der einzelnen Komponenten bestimmt werden kann, als sehr genaue quantitative Methode den immunchemischen Bestimmungen überlegen.

Diese jedoch zeichnen sich durch einfachere Handhabung und geringere Kosten aus, wobei einige wie die Immunfixation durch die semiquantitative Messung der Spaltprodukte auch Aussagen über den Funktionszustand der betrachteten Komponente erlauben.

A. *Hämolytische Testsysteme zum Screening des Gesamtkomplements*

2.1. Grundlagen hämolytischer Testsysteme

Als Standardmodell dient z.B. die Lyse von Zellen nach Komplementeinwirkung. Die quantitative Beurteilung dieser Reaktion ist über die Bestimmung des Lysegrades möglich. Dabei erwiesen sich Erythrozyten als besonders geeignet, da bei diesen Zellen die Ein-Treffer-Theorie, d.h. ein gebundenes, effektives Molekül (C1, C3b) bewirkt die Lyse eines Erythrozyten (KABAT *et al.* 1961, GEE 1983), erfüllt ist, und das freigesetzte Hämoglobin spektrophotometrisch gemessen werden kann.

Erstmals wurde ein solches Modell von KABAT und MAYER entwickelt, um die Aktivität des Gesamtkomplements über den klassischen Weg zu erfassen. Sie verwendeten als Aktivatoren Erythrozyten, an die ein Antikörper gebunden war (EA-Zellen), und bestimmten den Lysegrad nach Einwirken von verdünnten Seren unter festgelegten Bedingungen. Diese sogenannte Titration des Komplements ergibt nach graphischer Auswertung eine dosisabhängige, sigmoidale Kurve, welche linearisiert der Ermittlung eines " CH_{50} "-Wertes dient.

Diese Einheit definiert diejenige Menge an Komplement, die unter Standardbedingungen 50 % der EA-Zellen lysiert. Die Bestimmung dieser Einheiten stellt auch heute noch eine wichtige Methode der klinischen Diagnostik dar.

Dieses Modell kann auf den alternativen Weg übertragen werden, wie es erstmalig PLATTS-MILLS und Mitarbeiter 1974 veröffentlichten. Hierbei stellen bestimmte Erythrozyten sowohl die Aktivatoren als auch die Zielzellen der Lyse dar. Somit ist die Erfassung der korrespondierenden " ACH_{50} "-Werte möglich.

Die auf diese Weise ermittelte Komplementaktivität ist streng an gewisse Standardreaktionsbedingungen gebunden.

2.1.1. Einfluß der Reaktionsbedingungen

- Zellkonzentration : Bei Erhöhung der Erythrozytenzahl steigt gleichzeitig die Menge Komplement, die für eine 50 %ige Lyse benötigt wird, an.
- Reaktionsvolumen : Die hämolytische Aktivität variiert umgekehrt proportional zum totalen Reaktionsvolumen.
- Temperatur : Meist 37°C, bei Temperaturen um 30°C ergeben sich höhere Titer und ein verzögerter Endpunkt der Titration.
- pH-Wert : Ideale Werte der Enzymaktivität liegen bei 7,15-7,60; jede Verschiebung außerhalb dieses Bereiches bewirkt eine Hemmung der Reaktion.
- Ionenstärke : Bewirkt Bindung bzw. Dissoziation der einzelnen Komponenten
- Divalente Kationen
 Calcium : Wichtig für die Aktivierung und den inneren Zusammenhalt der Komponente C1
 Magnesium : Die Bindung von C4b an das Proenzym C2 und die Bildung der Alternativen C3-Konvertase sind Mg^{++} -abhängig
 Ein optimaler Einfluß beider Ionen auf die Komplementreaktion erfolgt nur in einem bestimmten, engen Konzentrationsbereich.

2.1.2. Standardisierung der Erythrozyten

Die Hammel - bzw. Kaninchenerythrozyten wurden mehreren Waschgängen unterworfen und in Puffer (K3) aufbewahrt. Vor der Sensibilisierung mit Anti-Schaf-Kaninchenhämolysin und ebenso vor der Testinkubation wurde mit den E-Zellen und den EA-Zellen eine genaue Zellzahleinstellung durchgeführt. Mit Hilfe einer Eichkurve aus Extinktionsmeßwerten des freigesetzten Hämoglobins nach Totalhämolysen und gleichzeitig ermittelten Zellzahlen, erfolgte die Einstellung auf eine festgelegte Zellzahl.

Die spektrophotometrische Auswertung der Lyse fand bei einer Wellenlänge von 412 nm statt. An diesem Punkt fallen die Maxima von Oxy- und Methämoglobin zusammen. Ein weiterer Grund für die Auswahl dieser Wellenlänge war die zehnfach höhere Sensitivität gegenüber der ebenfalls in der Literatur (HEINZ *et al.* 1985) verwendeten Wellenlänge von 541 nm.

In den von uns etablierten klassischen Testsystemen CP 1 und CP 2 verwendeten wir für die Sensibilisierung eine Hammelerythrozytenzellzahl von $1,18 \cdot 10^9$ Zellen/ml. Im Test selbst wurden $2,5 \cdot 10^8$ EA-Zellen/ml eingesetzt; dabei lag der Extinktionswert der Totalhämolysen bei 0,095 (E.2.1.3.4.).

Bei der Komplementaktivitätsmessung des Alternativen Weges wurde für den gleichen Extinktionswert eine Zellzahl von $1,0 \cdot 10^8$ Kaninchenerythrozyten/ml ermittelt. Diese Zellzahl wurde in den Testsystemen AP 1 und AP 2 verwendet.

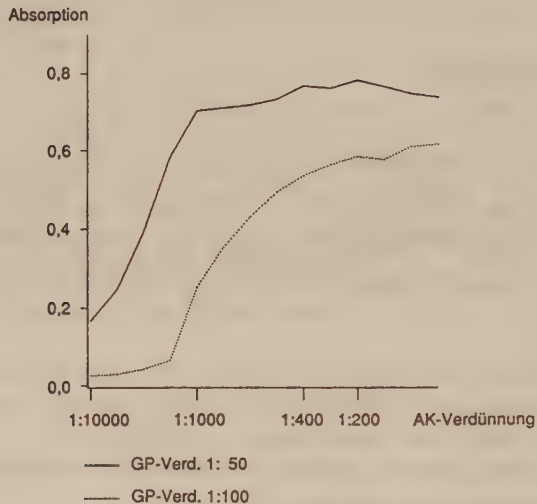
Innerhalb der Testsysteme wurden die Erythrozyten nochmals einer Totalhämolysen im Reaktionsvolumen (F-Wert) und einer Überprüfung ihrer Qualität mit Hilfe einer Eigenhämolysen unter den gegebenen Reaktionsbedingungen (D-Wert) unterzogen.

2.1.3. Antikörpertitration

Die hämolytische Effizienz des Serums im klassischen Weg hängt vom Grad der Sensibilisierung der Erythrozyten ab (KABAT *et al.* 1961). Um die Ergebnisse von der Antikörpermenge unabhängig zu machen, wurde die optimale Antikörperkonzentration durch Titration bestimmt. Dabei wurde eine konstante Anzahl Erythrozyten mit fallenden Mengen an Antikörper sensibilisiert und mit einem Überschuß an Komplement (16 CH₅₀-Einheiten) inkubiert (RINGELMANN *et al.* 1969).

Bei der graphischen Darstellung der prozentualen Lyse zeigte sich ab einer gewissen Antikörperverdünnung eine Plateaubildung mit einem konstanten Hämolysengrad, der das maximale Ausmaß der Sensibilisierung repräsentiert. Der in den klassischen Testsystemen später verwendete Antikörper mußte über eine Plateaubildung während eines größeren Konzentrationsbereiches verfügen (Abb. 6).

Bei der Inkubation I wurden nur 9 CH₅₀-Einheiten an Komplement zugesetzt, bei der Inkubation II jedoch 16 Einheiten. Obwohl die Zellzahl der zweiten Inkubation um 15 % gesteigert war, wurde das Plateau bei geringerer Antikörperkonzentration erreicht. Im Test wurde die 3,2fache Verdünnung (1:125) derjenigen Antikörperkonzentration verwendet, bei der gerade das Plateau erreicht wurde.

Abb. 6 : Antikörpertitration

Hämolyse, die bei einer konstanten Menge Komplement und ähnlicher Zellzahl mit steigenden Mengen hämolytischer Antikörper-Verdünnung erhalten wird.

2.1.4. Komplementtitration GP 1 / NHS 1

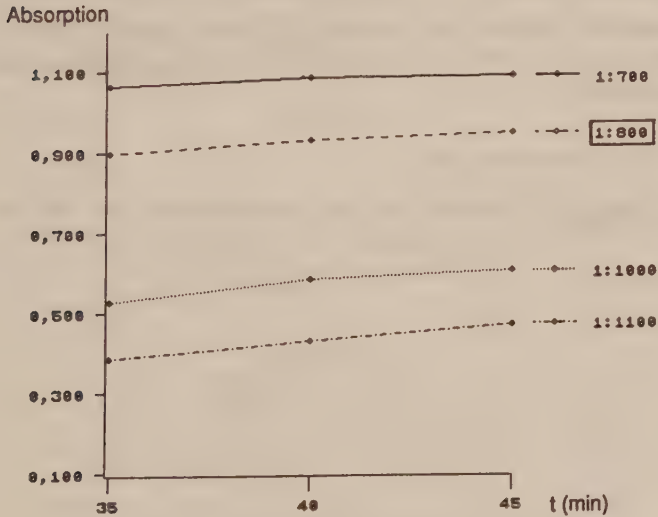
Bei der Titration des Gesamtkomplements nach dem Klassischen Weg wurde die Lyse sensibilisierter Erythrozyten durch eine Serienverdünnung von Meerschweinchen (GP)- bzw. menschlichem Serum (NHS) gemessen. Mit Hilfe dieser Titerbestimmung sollte die optimale Komplementverdünnung jedes Serums unter standardisierten Reaktionsbedingungen ermittelt werden.

Die Titration GP 1/ NHS 1, die als orientierende Untersuchung der verwendeten Seren diente, wurde in ihrem Prinzip für alle Testsysteme des Klassischen und des Alternativen Weges eingesetzt. Sie lehnte sich eng an den Verlauf des Testsystems CP 1 an und wurde für dieses Testsystem durch eine zweite Titration GP 2 / NHS 2, die zur Ermittlung der CH_{50} -Einheiten diente, ergänzt.

Verschiedene Serumverdünnungen wurden unter den jeweiligen Testbedingungen mit Erythrozyten inkubiert; der zeitliche Verlauf der Hämolyse wurde ermittelt. Folgende Kriterien dienen zur Festlegung der optimalen Verdünnungsstufe : einerseits sollte nach stetigem Ansteigen der Lysegrad während der letzten Minuten der Inkubation nur noch flach verlaufen, andererseits sollten die erzielten Extinktionswerte im Bereich von 0,800 bis 1,100 liegen (Abb. 7).

Für die klassischen Testsysteme wurden mittlere GP-Verdünnungen von 1:800 (1:700-1:900) und NHS-Verdünnungen von 1:250 (1:150-1:400), für die Alternativen Testsysteme ein mittlerer NHS-Titer von 1:18 (1:16-1:20) gefunden.

Abb. 7 : Komplementtitration GP 1



2.1.5. Komplementtitration GP 2 / NHS 2

Diese Titrationmethode dient zur genauen Ermittlung der CH_{50} -Werte von Seren unter Zugrundelegung der von Krogh-Gleichung, die die Beziehung zwischen Komplementkonzentration und dem Ausmaß der Hämolyse beschreibt.

$$x = k \cdot \left(\frac{y}{1-y} \right)^{\frac{1}{n}}$$

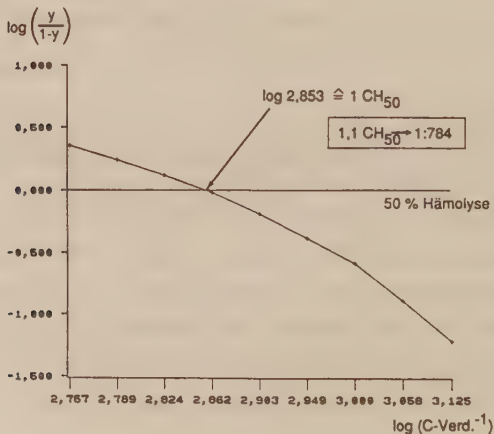
Durch Logarithmieren wird eine Linearität erreicht, wobei auf der Ordinate die Serumverdünnungen und auf der Abszisse der Hämolysegrad aufgetragen sind. Die resultierende Gerade schneidet die Abszisse, wenn der Ausdruck $\log [y / (1-y)]$ Null ergibt, d.h. y den Wert 0,5 (50 %ige Lyse) annimmt. Der inverse Logarithmus dieses Schnittpunkts entspricht jenem Titer des Serums, der eine CH_{50} -Einheit repräsentiert (GARVEY *et al.* 1977).

Ausgehend von dem in der Titration GP 1/NHS 1 ermittelten Titer wurden tiefere und höhere Serumverdünnungen mit EA-Zellen inkubiert und die prozentuale Lyse, bezogen auf die Totalhämolyse, gemessen. Nach Logarithmierung beider Wertereihen wurde der Schnittpunkt der erhaltenen Geraden graphisch ermittelt und der Titer einer CH_{50} -Einheit berechnet (Abb. 8).

Die Titration in Abb. 8 wurde mit demselben Serum wie diejenige in Abb. 7 erstellt. Da im Testsystem selbst 1,1-1,2 CH_{50} -Einheiten eingesetzt werden sollten (ZWILLING 1977), ergab sich bei allen Seren eine gute Korrelation zwischen dem nach B.2.1.4. unter Testbedingungen ermittelten Titer und dem 1,1 CH_{50} -Einheiten repräsentierenden Titer nach B.2.1.5.

Abb. 8 : Komplementtitration GP 2

(graphische Ermittlung des opt. Komplementtiters nach der von Krogh-Gleichung)

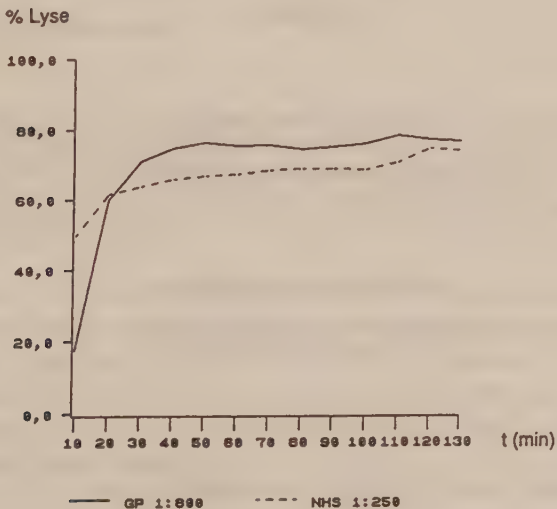


2.2. Bestimmung der Komplementaktivität im Klassischen Weg des Komplementsystems (CP)

2.2.1. Das Testsystem CP 1

Grundprinzip aller verwendeten Gesamtkomplement-Testsysteme, inklusive jener des Alternativen Weges, ist die Standardisierung sämtlicher Reaktionsbedingungen. Die Positivkontrolle (PK-Wert) stellte den auf diese Art und Weise erhaltenen Ablauf der Hämolysereaktion dar, der je nach Serumquelle variierte. Man erhielt eine zeitabhängige sigmoidale Kurve. Nach einer kurzen lag-Phase stieg die Reaktionsgeschwindigkeit mehr oder minder steil auf einen Maximalwert an, um dann wieder stark abzufallen. Ab ca. 90 % Hämolyse näherte sich die Reaktion asymptotisch dem Endpunkt. Dieser Endpunkt war bei Meerschweinchenserum unter Versuchsbedingungen nach 50 Minuten, bei menschlichem Serum nach 120 Minuten erreicht (Abb. 9).

Abb. 9 : Endpunkttitration im Testsystem CP 1
(limitiertes C-System)



Hämolysekinetik von opt.sensibil.EA-Zellen durch GP/NHS-Serum

TESTSCHEMA CP 1**Herstellung des Antigen-Antikörper-Komplexes**

(Sensibilisierung von Erythrozyten mit
dagegen gerichteten Antikörpern)

**Zugabe der Komplementkomponenten C1-9**

(Serumquelle GP/NHS; opt. C-Verd.)

**Inkubation**

(45 min, 37°C, $2,5 \cdot 10^8$ EA/ml in VBS-Puffer pH 7,3;
0,15 mM Ca^{2+} , 1 mM Mg^{2+} , opt. C-Verd.)

**Abstoppen der Reaktion**

(Eiswasser)

**Abtrennung der Erythrozyten**

(Zentrifugieren 480 g, 4°C, 5 min)

**Quantifizierung der Hämolyse**

(Spektrophotometrische Messung des
Oxyhämoglobins bei 412 nm)

Abb. 10 : Übersicht über ein Klassisches Komplementtestsystem (CP 1)

Innerhalb des Screenings von komplementaktiven Substanzen wurde die Reaktion vor dem Erreichen des Endpunkts abgestoppt.

Das Testsystem CP 1 (Abb. 10) wurde ohne Vorinkubation und vorwiegend mit GP-Serum bei niedermolekularen Drogeninhaltsstoffen verwendet. Bei einem Vergleich der Substanzaktivitäten in GP-Serum bzw. NHS-Serum wurden allgemein meist geringere Effekte in menschlichem Serum aufgefunden. Einige Triterpensäuren zeigten in NHS sogar statt der erwarteten Reduktion der Hämolyse eine Steigerung. Damit sind die Ergebnisse mit Meerschweinchenserum nicht in jedem Fall vorbehaltlos auf menschliches Serum übertragbar; sie können jedoch als orientierendes Screening dienen, wobei die Handhabung von GP-Serum einige Vorteile bietet. Innerhalb einer Serumquelle (z.B. verschiedene NHS) wurden keine signifikanten Differenzen in der Wirkqualität offensichtlich.

Um die Reproduzierbarkeit dieser Testmethode zu überprüfen, führten wir mit einer Konzentration der Referenzsubstanz Heparin mehrfach getrennte Musterinkubationen durch. Dabei erhielten wir eine Standardabweichung S_{n-1} von 1,76-2,18 % ; dem entsprach eine relative Standardabweichung S_{rel} von 3,74-5,84 %.

Ähnliche Grenzen der Methode wurden für die mehrfache Testung einer Substanz innerhalb einer Inkubation gefunden.

2.2.2. Das Testsystem CP 2

Dieses Testsystem kann als Sonderfall der in der Mikrobiologie und Medizin eingesetzten Mikrokomplementfixierung eingeordnet werden. Die zuerst ablaufende Reaktion wird mit Hilfe einer zweiten, sogenannten Indikatorreaktion, nachgewiesen. Normalerweise wird eine unbekannte Antigen-Antikörperreaktion, welche einen Komplementverbrauch bedingt, mit Hilfe des Hammelerythrozyten-Kaninchenantikörper-Komplexes sichtbar gemacht.

Im Testaufbau CP 2 fand als Erstreaktion während der Vorinkubation die Interaktion zwischen Komplement und getesteter Substanz statt. Eine Veränderung der Komplementaktivität zeigte sich bei Vergleich mit einem Kontrollansatz im Hämolysegrad der Indikatorreaktion. Ein Verbrauch an Komplement durch eine Substanz zieht eine Reduktion der Indikatorhämolyse nach sich, die damit ein Maß für die Komplementaktivität dieser Substanz darstellt (Abb. 11).

Abb. 11 : Schematische Darstellung des Testsystems CP 2

TESTSYSTEM (Vorinkubation)	INDIKATORSYSTEM (Inkubation)	RESULTAT (spektrophotometrische Messung)
C1-9 ↑ Aktivator	+ EA	keine Hämolyse
C1-9	+ EA	Hämolyse

Diagramm eines Komplementfixierungstests

Der entscheidende Unterschied zum Testaufbau CP 1 liegt bei diesem System somit in der Vorinkubation der Testsubstanzen mit konzentriertem Serum und der späteren Verdünnung auf den ermittelten optimalen Titer. Während die Vorinkubationszeit fest definiert ist, variiert die Dauer der zweiten Inkubation je nach Hämolyseverlauf. Alle weiteren Reaktionsbedingungen entsprechen dem Testsystem CP 1, wobei jedoch nur mit menschlichem Komplement gearbeitet wurde. Der Methodenfehler ähnelt CP 1 mit einer Standardabweichung S_{n-1} von 2,68 - 6,20 %, wobei sich eine relative Standardabweichung von 2,15 - 4,70 % ergab.

2.2.3. Funktionelle Erfassung der Komplementkomponente C1

Da der Titer der Gesamtaktivität des Komplements von dem Zusammenspiel der ca. 20 Komplementkomponenten abhängt, kann die Erniedrigung des Spiegels einer Komponente - je nach ihrer Konzentration im Serum bzw. ihrer effektiven hämolytischen Potenz - den Hämolysegrad stark verringern. Dabei entspricht die Anzahl der hämolytisch wirksamen Moleküle keinesfalls bei jeder Komponente der Anzahl der tatsächlich vorhandenen.

So konnten ROTHER *et al.* 1974 zeigen, daß von 20 radioaktiv markierten C4-Molekülen nur eines gebunden wurde, 19 jedoch zu iC4 inaktiviert wurden. Von 20 gebundenen C4 ließ sich dann nur eines hämolytisch erfassen, so daß diese Komponente einen Korrekturfaktor von 400 aufwies.

Da bei der Komponente C1 ein Verhältnis 1:1 besteht (RINGELMANN *et al.* 1969) und dieser Komponente die Initialfunktion im Klassischen Weg zukommt, testeten wir komplementaktive Substanzen im Hinblick auf ihre Möglichkeiten, speziell C1 zu beeinflussen.

Für ein hämolytisches Einzelkomponentensystem benötigten wir Intermediärzellen, d.h. in diesem Fall sensibilisierte Erythrozyten, die schon diejenigen Komponenten an ihrer Oberfläche tragen, mit denen die Komponente im Test sowie die folgenden Vollzugskomponenten der Hämolyse reagieren sollen.

Wir verwendeten EAC4b-Zellen, die vorher unter definierten Reaktionsbedingungen aus EA-Zellen, C1 und C4 hergestellt wurden. Diese Zellen wurden zu der nativen oder durch eine Testsubstanz veränderten Komponente C1 gegeben. Danach wurden mit einem Überschuß der Komponente C2 die C3-Konvertase vervollständigt und die weiteren Komponenten der Kaskade in einem Schritt mit Hilfe eines Komplettierungsreagenzes hinzugefügt. Das Ausmaß der Hämolyse, bezogen auf eine unbeeinflusste Kontrollreaktion, war nur von der Konzentration der Komponente C1 abhängig, da alle weiteren Komponenten im Überfluß vorhanden waren.*

Da fast alle Komplementkomponenten verschiedener Spezies miteinander kompatibel sind, wurde gereinigtes humanes C1 verwendet, während alle anderen Komponenten aus Stabilitäts- und Preisgründen von Meerschweinchenserum stammten.

Die Ionenstärke eingesetzter Puffer spielt eine große Rolle bei der Bindung bzw. Dissoziation von C1q. RAPP und BORSOS zeigten, daß bei $\mu=0,065$ die stärkste Bindung, bei $\mu=0,15$ völlige Dissoziation erfolgt. Mit Hilfe veränderter Ionenstärke konnten wir die Bindungsfähigkeit von Testsubstanzen an C1q überprüfen.

* Dieses Testsystem wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. T. Borsos im Institut für Biochemie, Prof. Dr. H. Isliker, Epalinges, Schweiz aufgebaut.

2.3. Bestimmung der Komplementaktivität im Alternativen Weg des Komplementsystems (AP)

2.3.1. Das Testsystem AP 1

Um ein Testsystem aufbauen zu können, das selektiv nur den Alternativen Weg C3-9 abdeckt, muß die hämolytische Reaktion mittels eines spezifischen Aktivators gestartet werden. Seit längerem ist eine Anzahl von Substanzen, wie Zymosan oder der Cobra Venom Faktor, bekannt, die an Stelle der Antigen-Antikörper-Komplexe des Klassischen Weges im Alternativen Weg eine Aktivierungsfunktion ausüben. Bei orientierenden Versuchen mit Hammelerythrozyten, menschlichem Serum und Zymosan als Aktivator erhielten wir eine wenig sensitive, verzögert ablaufende Hämolysereaktion. Dagegen erwies sich ein erstmals von PLATTS-MILLS *et al.* 1974 beschriebenes Testsystem als sensitiv und gut reproduzierbar. Ohne eine von außen hinzugefügte Substanz sind die verwendeten Kaninchenerythrozyten durch spezifische Oberflächenmembranbestandteile befähigt, den Alternativen Weg zu aktivieren und gleichzeitig als Zielzelle der Hämolyse zu dienen.

Der Klassische Weg - und damit eventuell vorhandene Antigen-Antikörperkomplex-Aktivität im Serum - wurde durch einen speziellen, chelatbildenden Mg^{++} -EGTA Puffer ausgeschaltet. Dieser Puffer weist für Calcium gegenüber Magnesium eine zweifach höhere Bindungskonstante auf, die stark pH-abhängig ist (optimaler Bereich 7,2-7,6). Durch die Entfernung jeglichen Calciums ist die Fixierung von C1 abgeblockt und der Zerfall des tertiären C1-Komplexes gefördert.

Auch in der Reaktionskinetik unterschied sich dieses Testsystem von den vorher errichteten Klassischen. Nach einer längeren Lag-Phase erfolgte ein fast linearer Anstieg, dessen Reaktionsgeschwindigkeit von der Serumkonzentration direkt proportional abhängig war. Durch Verringerung der Inkubationstemperatur wurde nur die Initialphase verlängert, die Reaktionsgeschwindigkeit blieb unbeeinflusst.

Tab. 2 : Unterschiede der Testsysteme CP 1 und AP 1

CP 1	AP 1
sensibilisierte Hammeler erythrozyten	Kaninchener erythrozyten
$2,5 \cdot 10^8 \text{ Z/ml}$	$1,0 \cdot 10^8 \text{ Z/ml}$
Akt.: AgAk-Komplex	Akt.: Erythrozyten
NHS 1:250-1:300	NHS 1:16-1:18
$\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++}$	Mg^{++} -EGTA

2.3.2. Das Testsystem AP 2

Dieses Testsystem vereinigt den grundlegenden Aufbau eines hämolytischen Alternativen Systems wie z.B. AP 1 mit dem Testverlauf des Systems CP 2. Nach einer getrennten Vorinkubation der Testsubstanzen mit konzentriertem menschlichem Serum wurde diese Reaktion durch ein modifiziertes AP 1 - System detektiert.

2.4. Quantifizierung des Einflusses von Substanzen auf den Ablauf der Komplementkaskade

Konzentration der Substanzen im Test CP 1, AP 1 :

Niedermolekulare Stoffe : $\frac{\text{MG} \cdot 6,5}{10000} \text{ mg/ml } (10^{-4} \text{ M})$

Hochmolekulare Stoffe : mg/ml

Da die Substanzen in den Testsystemen CP 2 und AP 2 auf konzentriertes Serum im Verhältnis 1:3 einwirkten, ergab sich ein Umrechnungsfaktor von 2,2, um Ergebnisse aus unterschiedlichem Testaufbau zu vergleichen.

Die prozentuale Beeinflussung des Komplements wurde spektrophotometrisch durch Vergleich von Extinktionen ausgewertet. Dabei gingen eine Reihe von Kontrollwerten in die Berechnung ein. Speziell zu erwähnen sind die Überprüfung der Zytotoxizität der getesteten Substanzen ($NK_{\text{Subst.}}$) und die Eigenfärbung sowohl der Substanzlösungen als auch der eingesetzten Serumverdünnung.

So setzt sich der Substanzextinktionswert wie folgt zusammen :

$$\text{Ext.}_{\text{Substanz}} = \text{Ext.}_{\text{Subst.gemessen}} - (NK_{\text{Subst.}} + E\text{-Wert}_{\text{Subst.}} + E\text{-Wert}_{\text{NHS}})$$

Die Aktivität einer Substanz wurde als prozentuale Reduktion der Hämolyse ausgedrückt :

$$\% \text{ Reduktion der Lyse} = 100 - \frac{\text{Ext.}_{\text{Subst.}}}{\text{Ext.}_{\text{PK-Wert}}} \cdot 100$$

2.5. Untersuchungen über mögliche Verfälschungen der Testergebnisse

2.5.1. Kontaminationen

Bei der Testung des klassischen und alternativen Weges muß auf Pyrogenfreiheit der verwendeten Puffer und der eingesetzten Substanzen geachtet werden, da von Pyrogenen eine aktivierende Potenz bekannt ist. Da sich eine solche Beeinflussung im konzentrierten Serum sehr viel stärker auswirkt, wurden die Systeme CP 2/AP 2 zur Überprüfung herangezogen.

In parallelen Inkubationen wurden drei Puffer mit unterschiedlicher Wasserqualität (dest. Wasser, pyrogenfreies Ampuva[®], unter Zusatz zweier differierender Chargen Gelatine) in ihrem Einfluß auf die Hämolyse einer festgelegten Menge an Komplement untersucht. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Verlauf und Maximalwert der Hämolyse.

Daneben wurden drei Lipopolysaccharide (Salmonella enteritidis, E.coli, Serratia marcescens) getestet, um einen Anhaltspunkt für den relevanten Konzentrationsbereich einer möglichen Verunreinigung zu erhalten.

Dabei ergaben sich starke Unterschiede zwischen den LPS-Arten : Lediglich das LPS von *Salmonella* zeigte in einer Konzentration von 0,1 mg/ml einen ca. 50 %igen Einfluß, bei 0,01 mg/ml war keine Auswirkung auf die Hämolyse nachzuweisen.

Daraus wird ersichtlich, daß eine Verunreinigung von 1 % und weniger bei einer Einwaage von 1 mg/ml vernachlässigbar wäre.

Die Gefahr einer LPS-Verunreinigung ist bei den hochmolekularen Verbindungen am wahrscheinlichsten. Daher wurden einige Polysaccharide durch Affinitätschromatographie an Polymyxin B-Agarose gereinigt (ISSEKUTZ 1983) und mit und ohne diesen Reinigungsschritt in demselben Testsystem in einer Konzentration von 1 mg/ml überprüft. Bei den meisten Substanzen zeigten sich keine Differenzen. Der höchste ermittelte Aktivitätsunterschied betrug 10 %. Eine weitere Absicherung der Ergebnisse wurde bei sehr aktiven Substanzen mit Hilfe des Limulustestes (Faktor G freies Lysat, OBAYASHI *et al.* 1986) erreicht.

2.5.2. Hämagglutination

Zur Hämagglutination, d.h. der Aggregation von Erythrozyten, sind unter anderem Substanzen mit Lektineigenschaften befähigt. Da die hämolytischen Testsysteme auf der Basis von Erythrozyten ablaufen und einige Lektine aus dem Pflanzen- und Tierreich einzelne Komplementkomponenten binden können (BOYLE *et al.* 1978, VALERO *et al.* 1982), wurde der Einfluß hochmolekularer Substanzen auf die verwendeten Erythrozyten unter Testbedingungen überprüft.

Die jeweiligen Inkubationsansätze wurden auf das Well-Volumen einer Mikrotiterplatte reduziert und nach zwei Stunden Raumtemperatur visuell mit einer Kontrolle verglichen. Wenn statt einer "Knopf-" die charakteristische "Teppichbildung" einer Hämagglutination beobachtet wurde, erfolgte eine mikroskopische Überprüfung der Reaktion. Besonders bei Kaninchenerythrozyten wurde oft eine Hämagglutination durch getestete Substanzen vorgetäuscht, die sich mikroskopisch nicht nachweisen ließ. Die "Teppichbildung" kann in diesen Fällen auch durch eine Ladungsverschiebung auf der Membranoberfläche der Erythrozyten stattfinden, wie sie besonders bei polyanionischen Substanzen wie Heparin beobachtet werden kann (UHLENBRUCK 1987).

2.5.3. Chelatbildende Eigenschaften

Substanzen mit chelatbildenden Eigenschaften wie EDTA, Citrat oder Polyanionen können die Komplementreaktion durch Bindung der essentiellen Kationen Calcium und Magnesium inhibieren. Um bei polyanionischen, hochmolekularen Verbindungen solche Effekte auszuschließen, wurde der Magnesiumgehalt des Mg^{++} -EGTA-Puffers im Testsystem AP 2 um das Dreifache erhöht. Nach unseren Ergebnissen besteht schon im Ausgangspuffer ein genügend großer Überschuß an Magnesium, da sich keinerlei Veränderungen zeigten.

2.5.4. Lösungsmittel

Bedingt durch ihre Proteinnatur sind die Komponenten der Komplementkaskade leicht durch physikalische und chemische Noxen (Temperatur, Säure, Alkali, Detergentien, organische Lösungsmittel) denaturierbar.

Um diese Effekte auszuschließen, wurden hochmolekulare und hydrophile Verbindungen im Screening immer in den jeweils verwendeten Puffern gelöst. Diese Lösung wurde dann auf pH 7,3-7,4 eingestellt.

Um die Löslichkeit lipophiler Extrakte und Drogeninhaltsstoffe im Puffersystem zu gewährleisten, wurden organische Lösungsmittel in Anteilen von 2-8 % als Lösungsvermittler zugesetzt. In den Testsystemen mit verdünntem Serum (CP 1, AP 1) zeigte Dimethylsulfoxid (DMSO) bis zu einer Konzentration von 6 % nur einen geringen komplementinhibierenden Einfluß ($6,7 \pm 2,1$ % bei 6 % DMSO). Aceton und Ethanol übten in einer Konzentration von 2 % eine ähnlich schwach hemmende Wirkung aus. Dagegen beeinflussten 2 % Methanol oder n-Butanol sowie höhere Konzentrationen von DMSO oder Ethanol die Komplementreaktion stark (15 - 30 % Inhibition). In den Testsystemen, die mit einer Vorinkubation der Substanzlösungen in konzentriertem Serum erfolgen (CP 2, AP 2), war der Einfluß organischer Lösungsmittel deutlich höher (6 % DMSO : $18,0 \pm 2,0$ %). Beim Einsatz organischer Lösungsmittel wurden die ermittelten Hämolysewerte der Substanzen immer auf die entsprechenden Kontrollwerte bezogen.

2.5.5. Drogenbegleitstoffe

Zu den Drogenbegleitstoffen werden in diesem Zusammenhang Pflanzeninhaltsstoffe gerechnet, die einen Bestandteil vieler Rohextrakte darstellen. Unter diese Kategorie fallen Chlorophyll und die wegen ihrer denaturierenden Eigenschaften bekannten Gerbstoffe. Bei einem angenommenen Molekulargewicht von 900 bewirkte Chlorophyll in einer Konzentration von 10^{-4} M 60 %, bei 10^{-5} M immerhin noch 20 % Reduktion der Hämolyse im Testsystem CP 1. Bei den Gerbstoffen zeigten Tannin, sowie Tetra- und Pentagalloylglucose eine starke Beeinflussung der Komplementreaktion (80-90 % verringerte Hämolyse bei 10^{-5} M). Die Wirkung der Gallotannine sinkt mit abnehmender Gallussäurezahl (z.B. ca. 25 % bei Trigalloylglucose 10^{-5} M). Ellagerbstoffe wie z.B. die Chebulinsäure wirkten in einer Konzentration von 10^{-4} M stark antikomplementär. Diese Einflüsse traten in den Testsystem CP 1 und AP 1 in ähnlichem Maße auf. Da sich ihre antikomplementär wirksamen Konzentrationen mit dem üblicherweise verwendeten Konzentrationsbereich in Komplementtestungen niedermolekularer Stoffe decken, müssen Chlorophyll wie auch Gerbstoffe unbedingt vor dem Screening von Pflanzenextrakten abgetrennt werden.

Beim Einsatz von Pflanzenrohextrakten sollten außerdem störende Einflüsse verschiedener Anionen und Kationen berücksichtigt werden.

B. *Immunchemische Methoden zum Screening einzelner Komplementkomponenten*

2.6. Nachweis der Aktivierung der Komponente C3 mit Immunelektrophorese

Bei der Aktivierung der Komponente C3 über den klassischen oder alternativen Weg wird das native Molekül zunächst in die Fragmente C3a und C3b gespalten. Der weitere Abbau von C3b führt u.a. zu den Bruchstücken C3c und C3d. Da C3 und seine meisten Abbauprodukte eine antigene Determinante darstellen, können sie über die Präzipitation von Immunkomplexen erfaßt werden. Dabei ähneln die Spalt- und Abbauprodukte dem nativen C3 strukturell so stark, daß sie alle mit Antiserum gegen C3 erfaßt werden können. Mittels einer vorgeschalteten Elektrophorese erfolgt eine Auftrennung der Teilkomponenten nach Molekulargewicht und ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität (GÖTZE *et al.* 1971).

Basierend auf diesen Grundlagen bauten wir ein Immunelektrophorese-Testsystem zum qualitativen Screening komplementaktivierender Eigenschaften von hochmolekularen Substanzen auf.

Nach der Inkubation mit menschlichem Serum wurde eine Agarose-Flachbettelektrophorese ausgeführt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit Anti-Human C3, wobei die Präzipitationsbanden nach Auswaschen der nicht gebundenen Proteine angefärbt und visuell ausgewertet wurden. Als positive Reaktion und damit Aktivierung von C3 wurde das Erscheinen eines zusätzlichen Immunpräzipitatbogens auf der anodischen Seite des nativen C3 Bogens bewertet.

Abb. 12 : Immunelektrophorese

(Aktivierung der Komponente C3 durch Glykogen (Myt.ed.), Inulin als Referenz)

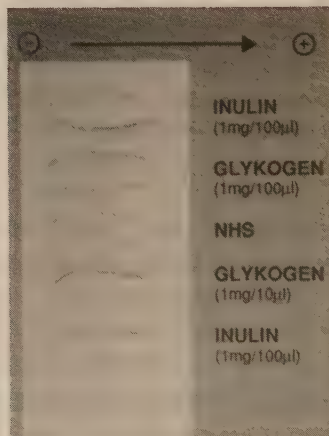


Abb. 12 zeigt die Aktivierung von C3 durch das Glykogen der Miesmuschel (*Mytilus edulis*, Fa. Sigma) mit Inulin als Positivkontrolle (siehe auch C.3.3.2.). An der Negativkontrolle, dem nativen NHS, wird durch die leichte Krümmung des Bogens ersichtlich, daß allein durch die gewählten Inkubationsbedingungen eine geringe Aktivierung stattgefunden hat.

2.7. Nachweis der Aktivierung der Komponente C3 und des Faktors B durch Immunfixation

Nach SUN *et al.* 1986, stellt die Immunfixation bei Vergleich verschiedener Immun-elektrophoresemethoden die sensitivste Detektionsmöglichkeit für Komplementaktivierung dar. Diese Methode erlaubt die Unterscheidung der einzelnen C3 - bzw. Faktor B - Fragmente und ihre Quantifizierung.

Nach der Inkubation der Testsubstanz mit menschlichem Serum wurde eine Elektro-phorese in Agarosegel durchgeführt, wobei die C3-Spaltprodukte und das Fragment Ba der Faktor B-Aktivierung in Richtung der Anode wandern, während das Fragment Bb zur Kathode wandert.

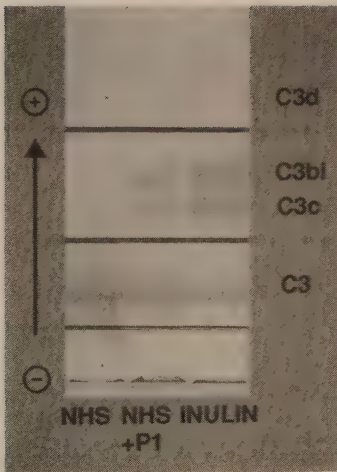


Abb. 13 : Immunfixation der Komponente C3

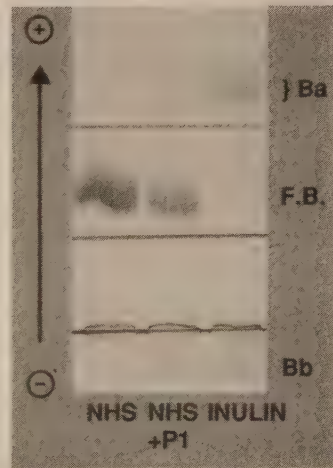


Abb. 14 : Immunfixation des Faktors B

Abb. 15 : Laserdensitometrische Auswertung der C3-Immunpräzipitate vor (A) und nach (B) der Inulinaktivierung

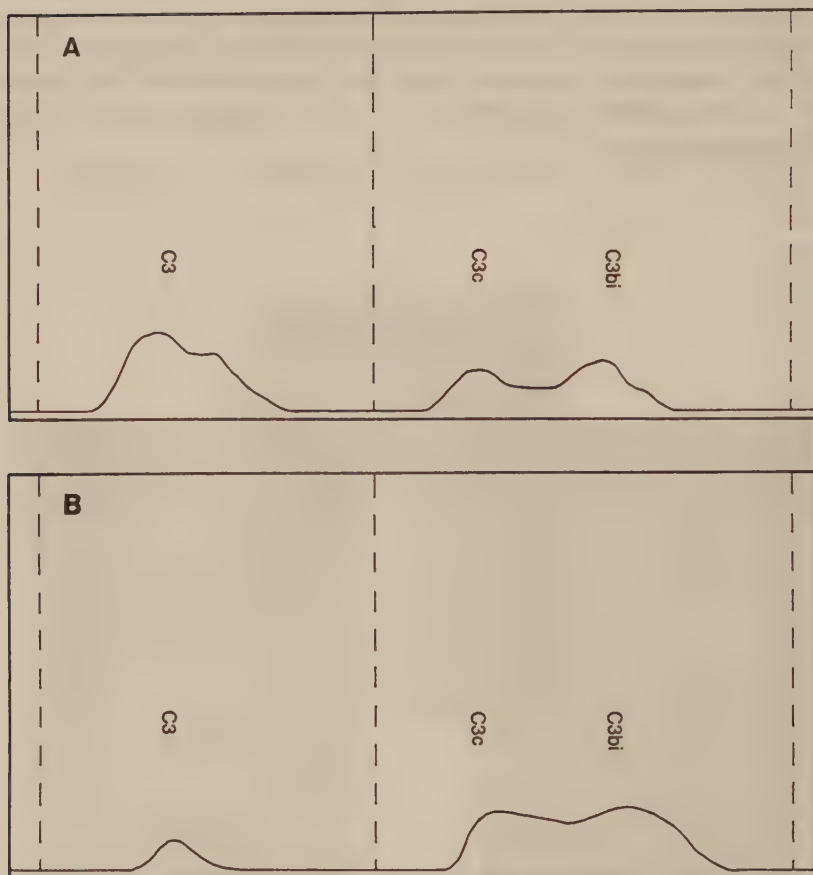
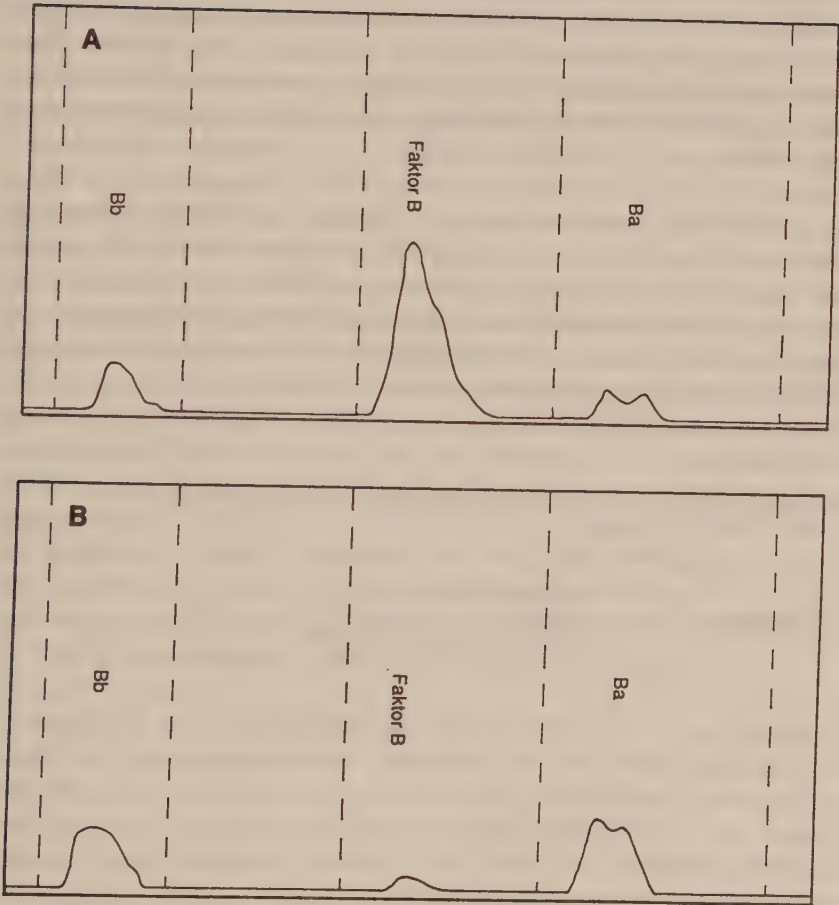


Abb. 16: Laserdensitometrische Auswertung der Faktor B - Immunpräzipitate vor (A) und nach (B) der Inulinaktivierung



Bei der nachfolgenden Immunpräzipitation wurde das Antiserum über die gesamte Platte gleichmäßig verteilt und damit eine Verkürzung der Diffusionszeit bewirkt. Die nicht auswaschbaren Antigen-Antikörperkomplexe wurden mit Coomassie Blau angefärbt und mit einem Laser Densitometer gemessen (MAUFF 1988, BECKER 1980).

Wie aus Abb. 13 und Abb. 14 ersichtlich ist, fand durch die Inkubationsbedingungen eine Eigenaktivierung statt, die bei der Komponente C3 einen Wert von $40,4 \pm 3,8 \%$, bei Faktor B $21,6 \pm 0,4 \%$ erreichte. Auch durch kürzere Inkubationszeiten konnte dieser Effekt nicht ausgeschaltet werden. Er war jedoch in verschiedenen Seren unterschiedlich stark und ging in die Berechnung als Kontrollwert ein. Wir verwendeten drei Einzelseren, wobei die auf die jeweiligen Kontrollen umgerechneten Werte gut korrelierten.

Bei der Auswertung werden die gemessenen Intensitäten der angefärbten Banden als Peakflächen dargestellt und das Verhältnis des konvertierten Anteils der Komponente zur Gesamtfläche berechnet. Zur Darstellung der Aktivierungsleistung einzelner Substanzen wurden sowohl die prozentualen Unterschiede zwischen Substanz und Kontrolle als auch der relative Prozentsatz bezogen auf den noch konvertierbaren Anteil des Serums herangezogen (Abb. 15, Abb. 16).

Abs. Aktivierung (%) = % konvert. Anteil Substanz - % konvert. Kontrolle

$$\text{Rel. Aktivierung (\%)} = \frac{\% \text{ konvert. Anteil Substanz}}{(100 \% - \% \text{ konvert. Kontrolle})} \cdot 100$$

2.8. Diskussion der Testsysteme

Von den sieben von uns etablierten Testsystemen wurden die hämolytischen Gesamtkomplementsysteme für das orientierende Screening eingesetzt, während mit Hilfe der Einzelkomponentensysteme versucht wurde, aktive Substanzen näher zu charakterisieren. Den Ausgangspunkt jedes Screenings stellte der Klassische Weg dar, der je nach getesteter Substanzklasse mit den Systemen CP 1 bzw. CP 2 überprüft wurde.

Die genauere Charakterisierung des Angriffspunkts am Komplementsystem erfolgte mit den entsprechenden Testen AP 1 und AP 2. Damit war eine zusätzliche Differenzierungsmöglichkeit ab der Komponente C3 gegeben. In allen Fällen wurde jedoch nur das Endprodukt des Zusammenspiels vieler Faktoren, die Hämolyse, gemessen.

Die Wirkqualität einer Substanz, die in einem in-vitro-System gemessen wird, kann grundsätzlich je nach gewählter Konzentration dualer Natur sein, d.h. eine Substanz kann sowohl eine **inhibierende** als auch eine **aktivierende Wirkung** ausüben. In den verwendeten Komplementtestsystemen jedoch konnte eine Substanz konzentrationsunabhängig zwei verschiedene Wirkungsmechanismen ausüben, da sowohl die **Inhibierung** einzelner Komponenten als auch der **Verbrauch** von Komplement durch Aktivierung sich als Reduktion der Hämolyse äußerten (BAKER *et al.* 1986). Eine gewisse Differenzierung ist über eine Vorinkubation der Substanz mit den Komplementkomponenten möglich. Substanzen, die ohne diese Vorinkubation keinerlei Wirkung entfalten, können als Aktivatoren des Systems angesehen werden.

Speziell zum Nachweis aktivierender Wirkungen eignen sich die Systeme CP 2 und AP 2. Sie wurden bevorzugt bei hochmolekularen Substanzen eingesetzt.

In Hinblick auf die unterschiedliche Verwendung der Begriffe pro- und antikomplementär in der Komplementliteratur bezeichneten wir alle Substanzen, die eine **Reduktion der Lyse** bewirkten, als **antikomplementär** ohne genauere Abklärung des Wirkmechanismus. Dagegen äußern sich **prokomplementäre** Effekte in einer **Lyseerhöhung**. Letztere können im Klassischen Weg durch eine gleichzeitige Aktivierung des Alternativen Weges, durch Inhibierungsreaktionen natürlicher Inaktivatoren der Kaskade oder durch Stabilisierung normalerweise labiler Komplexe wie der C3-Konvertase auftreten. Eine prokomplementäre Wirkung könnte ebenfalls durch eventuell vorhandene Antikörper in den verwendeten Seren verursacht werden.

Auch im hämolytischen Einzelkomponenten-Testsystem C1 folgt aus der Bindung der Komponente C1 an eine Substanz nicht ursächlich die Aktivierung des Klassischen Weges. Um sowohl den genauen Wirkmechanismus der getesteten Substanzen als auch deren exakte Angriffspunkte zu erkennen, müßte die Testung an einer Vielzahl von Einzelkomponenten durchgeführt werden.

Mit diesen Einschränkungen bietet die Kombination der verwendeten in-vitro-Testsysteme die Möglichkeit eines orientierenden Screenings von Pflanzeninhaltsstoffen und anderen Substanzen natürlicher Herkunft.

3. Untersuchungen von Drogeninhaltsstoffen auf Interaktionen mit dem Komplementsystem

Das Ziel systematischer in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen von Naturstoffen oder synthetischen Substanzen mit Wirkung auf die Komplementkaskade liegt in der Steuerung komplementvermittelter Krankheitsprozesse durch Inhibierung oder Aktivierung einzelner Komponenten. Dabei steht an erster Stelle die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren mit geringer Toxizität. Duale Inhibitoren sowohl des Klassischen als auch des Alternativen Weges sind durch die Erniedrigung beider Abwehrfunktionen und den dadurch entstehenden Nebenwirkungen nicht erwünscht. Hohe Spezifität des Angriffspunkts und hohe Serumspiegel in vivo wären die Merkmale eines idealen Inhibitors (VOGT 1985). In einigen Krankheitsbildern wie z.B. dem Tumorgeschehen scheinen Aktivator des Komplementsystems therapeutischen Nutzen zu bieten (OKUDA *et al.* 1972, YAMADA *et al.* 1986).

Eine Reihe therapeutisch wichtiger Daten ist aus in-vitro-Testungen von Substanzen nicht ableitbar. Sie können jedoch als Ausgangspunkt weiterführender Untersuchungen dienen.

3.1. Kenntnisstand

Seit der Etablierung hämolytischer Komplementtestsysteme durch KABAT und MAYER 1961 und nachfolgenden Modifizierungen wurden größtenteils synthetisierte Substanzen auf Komplementwirksamkeit getestet, während bei Naturstoffen nur einige phenolische Verbindungen und Polysaccharide untersucht wurden (VOGT *et al.* 1985, FUJII *et al.* 1984, ASGHAR 1984).

Bei ca. 70-80 % der Untersuchungen wurde lediglich eine Reduktion der Hämolyse in Gesamtkomplementtestsystemen des Klassischen Weges gemessen, die unseren Testsystemen CP 1 und CP 2 entsprachen. Dabei lag der wirksame Konzentrationsbereich niedermolekularer Inhaltsstoffe bei 10^{-3} - 10^{-4} M (CH_{50} -Werte in CP 1), während Polysaccharide in einer Konzentration von 0,1 mg/ml eine um ca. 25-45 % reduzierte Hämolyse bewirkten (CP 2). Eine Differenzierung des Angriffspunktes über den Alternativen Weg oder Testung von Einzelkomponenten wurde nur in wenigen Fällen durchgeführt. Daher ist meistens eine Beurteilung der Wirkungsweise dieser oft pauschal als Hemmwirkung bezeichneten Komplementaktivität nicht möglich.

Für eine in-vivo-Testung antikomplementärer Substanzen kommen Tiermodelle wie z.B. eine provozierte Arthusreaktion in Frage. Von Abietinsäurederivaten wie der Maleopimarsäure und von Suramin wurde über verringerte Erythembildung und eine reduzierte Infiltrationsrate in vivo berichtet (ASGHAR 1984, FUJII *et al.* 1984).

Die medizinische Anwendung komplementaktiver Substanzen wird bisher durch zu geringe Plasmaspiegel oder hohe Toxizität der Substanzen beschränkt. Nur die ϵ -Aminocaprinsäure und Suramin sind bisher in die Therapie zur Behandlung des Quinckeödems eingeführt (TAKADA *et al.* 1977).

Die wichtigsten, bisher bekannten und als Inhibitoren bzw. Aktivatoren bezeichneten Substanzen werden im folgenden kurz beschrieben, wobei eine Einteilung durch ihre vielfältigen Angriffspunkte an der Kaskade nur strukturell erfolgen kann.

A. Niedermolekulare Substanzen

Komplementaktive Substanzen	Angriffspunkt	Literatur
<u>Anorganische Substanzen</u> (Zn, Cyanate)	nicht bekannt (n.b.)	(ASGHAR 1984)
<u>Chelatbildner</u> (Amino-benzoessäurederivate, Cinnarizin)	C1r, C4b2a	(ASGHAR 1984)
<u>Allgemeine Protease-inhibitoren</u> : p-Nitrophenylphosphonate	C1s, Serinpro-teasen	(GLOVSKY <i>et al.</i> 1968)
Abietinsäurederivate	C1 + EA Bindung EAC5b67-Komplex	(FUJII <i>et al.</i> 1984)
Benzamidin und Analoge Mergetpa	C1s Faktor I	(BAKER <i>et al.</i> 1969) (VON ZABERN <i>et al.</i> 1986)
Langkettige Sulfonyl-fluoridderivate	C1	(BAKER <i>et al.</i> 1969)
Nafamostat (Guanidin-benzoessäurederivat)	C1r, C1s, Faktor D, B	(FUJII <i>et al.</i> 1984)
<u>Aminosäuren und kurz-kettige Polypeptide</u> : Cystein, Lysin aromatische Aminosäure-derivate Phenylalanin-Tyrosin Sequenz	C1 C1, C4b2a C4b2a3b	(ASGHAR 1984) (VOGT 1985) (KOSSOROTOW <i>et al.</i> 1977)
<u>ε-Aminocaprinsäure</u> <u>Anthranilsäurederivate</u>	C1, C3b1NA C3- und C5-Kon-vertase	(TAKADA <i>et al.</i> 1977) (VOGT 1985, ASGHAR 1984)

Mikrobielle Produkte :

Leupeptin	C1s	(TAKADA <i>et al.</i> 1977)
Complestatin	Faktor B	(KANEKO <i>et al.</i> 1980)
oxyd.Sesquiterpenderivat	C5	(HONG <i>et al.</i> 1979)

Suramin

mehrere (ASGHAR 1984)

Glucokortikoide

AP (ASGHAR 1984)

RöntgenkontrastmittelAP (ARROYAVE *et al.* 1977, SCHULZE 1981)Niedermolekulare Drogen-
inhaltsstoffe

Rosmarinsäure (Melissa off.)	C3	(ENGLBERGER <i>et al.</i> 1988)
Phytosterole	n.b.	(YAMADA <i>et al.</i> 1987c)
Plicatinsäure (Thuja plicata)	C1-INH	(GICLAS 1982)
Polygodial (Polygonum hydropiper)	n.b.	(FURUTA <i>et al.</i> 1986)
Genipin (Eucommia ulmoides)	n.b.	(OSHIMA <i>et al.</i> 1988)
Diterpene (Cinnamomum cassia)	n.b.	(YAGI <i>et al.</i> 1979)

B. Hochmolekulare Substanzen

Komplementaktive Substanz	Angriffspunkt	Literatur
<u>Lektine</u> (Con A, Lektin aus Euonymus europ.)	C1, C4, C2	(BOYLE <i>et al.</i> 1978, SCHULTZ <i>et al.</i> 1982)
<u>Lipopolysaccharide</u>	C1, C3	(BEUSCHER <i>et al.</i> 1986)
<u>Polynukleotide</u>	C1q + EA, C4	(PATRICK <i>et al.</i> 1980)

Sulfatierte Polysaccharide:

Heparin	C1q, C1s, C1-INH, Faktor H	(FUJII <i>et al.</i> 1984, PATRICK <i>et al.</i> 1980)
Carrageenan	C1q, AP	(BAKER <i>et al.</i> 1986)
Dextransulfat, Colistin- sulfat, Chondroitinsulfat, Pentosanpolysulfonester	C1q, C4b2a	(VOGT 1985, MAUZAC <i>et al.</i> 1985, ASGHAR <i>et al.</i> 1986)
<u>Neutrale Polysaccharide :</u>		
Zymosan, Lentinan, Nigeran, Pustulan, Pachyman, Inulin	AP	(OKUDA <i>et al.</i> 1972)

Hochmolekulare Drogen-
inhaltsstoffe :

saures Arabinogalaktan, Pektine (<i>Angelica acutiloba</i>)	n.b.	(YAMADA <i>et al.</i> 1984)
saures Arabinogalaktan und Heteroglykan (<i>Artemisia princeps</i>)	n.b.	(YAMADA <i>et al.</i> 1985, 1987a)
zwei saure Arabinogalaktane (<i>Coix lacryma-jobi</i>)	n.b.	(YAMADA <i>et al.</i> 1987b)
Gemisch aus neutralem Arabinan und Glucan (<i>Bupleurum falcatum</i>)	n.b.	(YAMADA <i>et al.</i> 1988)
neutrales Glucan (<i>Saccharum officinarum</i>)	n.b.	(XIAO-YU <i>et al.</i> 1983)
saures Glucuronoarabino- xylan (<i>Plantago asiatica</i>)	CP	(YAMADA <i>et al.</i> 1986)
saure Arabinoglucane und Pektine (<i>Panax ginseng</i>)	n.b.	(GAO <i>et al.</i> 1989)

Screeningergebnisse

3.2. Niedermolekulare Drogeninhaltsstoffe

Wie die Literaturübersicht zeigt, sind bis heute komplementaktive, niedermolekulare Substanzen pflanzlichen Ursprungs noch wenig untersucht. Daher unterzogen wir mehrere niedermolekulare Sekundärstoffklassen pflanzlicher Herkunft einem orientierenden Screening.

Da die Beurteilung der Aktivität und der Wirkungsstärke in einem 21-Komponentensystem leicht zu Fehlinterpretationen führen kann und Drogenbegleitstoffe falsch-positive Ergebnisse bewirken können, untersuchten wir Drogeninhaltsstoffe nur in reinem oder hochgereinigtem Zustand. Bei der Testung von vorgereinigten Extrakten einer Substanzklasse können sich additive Effekte ergeben, die eine potente, antikomplementäre Wirkung vorspiegeln. Für diese Screening-Untersuchungen erwiesen sich die Testsysteme CP 1 und AP 1 am zuverlässigsten, da der Einfluß vieler organischer Lösungsmittel in geringer Konzentration hier vernachlässigbar ist. Positiv kann auch die weniger stark ausgeprägte Neigung zu unspezifischen Adsorptionen von Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht in verdünntem Serum angesehen werden.

3.2.1. Flavonoide

Flavonoide, eine im Pflanzenreich ubiquitär vorkommende Substanzklasse, sind für Hemmwirkungen an verschiedensten Enzymsystemen bekannt. Bisher wurde nur für Quercetin eine antikomplementäre Aktivität beschrieben (27 %ige Reduktion der Hämolyse des Klassischen Weges bei 10^{-3} M) (MÜLLER-PEDDINGHAUS *et al.* 1984).

Da die Zahl und Substitution phenolischer Hydroxylgruppen offenbar einen Einfluß auf die Aktivität ausübt (GICLAS 1982, HONG *et al.* 1979), wurden verschiedene Substitutionstypen von Flavonoiden mit Hilfe des Testsystems CP 1 getestet.

Eine Darstellung der Ergebnisse ist in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3 : Antikomplementäre Wirkungen verschiedener Flavonoide im Klassischen Weg (CP 1)

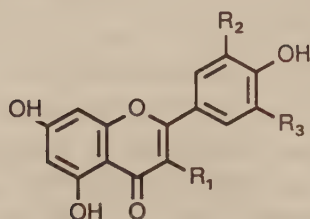


Abb. 17 : Flavon

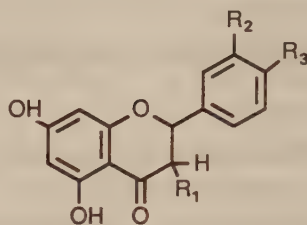


Abb. 18 : Flavanon

Substanz	R ₁	R ₂	R ₃	Reduktion der Hämolyse in % (CP1)	
				5 · 10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁴ M

Abb. 17

Apigenin	H	H	H	6,4 ± 1,3	-
Luteolin	H	OH	H	10,2 ± 2,4	7,5 ± 0,8
Vitexin	Apigenin-8-C-glucosid			6,4 ± 2,2	n.t.
Quercetin	OH	OH	H	n.l.	18,2 ± 4,1
Myricetin	OH	OH	OH	97,1 ± 1,3	56,4 ± 2,1
Rutin	Quercetin-3-O-rutinosid			43,3 ± 2,1	31,6 ± 7,5
Hyperosid	Quercetin-3-O-galaktosid			71,4 ± 4,2	31,0 ± 3,4

Abb. 18

Naringenin	H	H	OH	50,3 ± 6,1	19,1 ± 2,5
Eriodictyol	H	OH	OH	51,7 ± 5,1	11,3 ± 2,1
Homoeriodictyol	H	OCH ₃	OH	36,9 ± 3,1	-
Hesperetin	H	OH	OCH ₃	49,8 ± 1,8	-
Naringin	Naringenin-7-O-neohesperidosid			32,5 ± 3,6	13,5 ± 4,5
Neohesperidin	Hesperetin-7-O-neohesperidosid			31,6 ± 0,2	10,1 ± 4,1
Taxifolin	OH	OH	OH	67,9 ± 7,9	15,5 ± 2,4
Silibinin	Taxifolin - Coniferylalkohol-Kondensationsprodukt			36,1 ± 1,5	26,3 ± 2,9

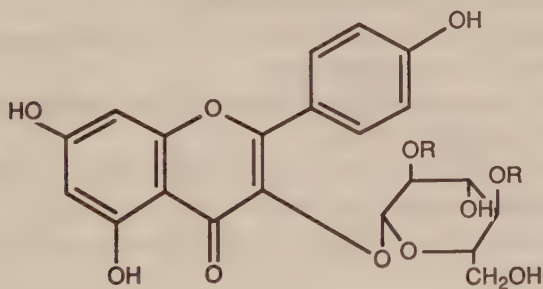
Mittelwerte aus 3-5 Messungen ± S.D.

- = Hemmung ≤ 5 %

n.t. : nicht getestet, n.l. : nicht löslich

Den größten Einfluß auf den Klassischen Weg des Komplementsystems übten die im Ring B stark hydroxylierten Aglyka der Flavonol-, Flavanon- und Flavanonol-Reihe aus. Eine Glykosidierung am C3 oder C7 verbesserte zwar teilweise die Löslichkeit, verringerte aber die Wirkung. Wenn die Zuckerkomponente an der Hydroxylgruppe in Position 3 des Flavonoidgrundgerüsts mit Cumarsäure verestert ist, wie z.B. im Di-cumaroyl-astragalin, stieg die antikomplementäre Wirkung stark an. Durch Acetylierung der anderen freien Hydroxylgruppen des Zuckers ging dieser Effekt vermutlich durch eine sterische Hinderung wieder verloren.

Das Di-cumaroyl-astragalin, aus den Blättern von *Quercus ilex*, Fagaceae, war mit einer Wirkung von 70 % bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-5}$ M eine potente antikomplementäre Substanz. Eine Wirkung dieses Ausmaßes wurde ebenfalls im Testsystem AP 2 erzielt, während in CP 2 das Ergebnis negativ ausfiel. In der Immunfixation war Di-cumaroyl-astragalin nicht zur Konvertierung der Komponente C3 oder des Faktors B in der Lage (0,25 mg/40 µl NHS). Die Substanz scheint jedoch an beiden Wegen des Komplements anzugreifen (Tab. 4). In in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen wurde für dieses Flavonolderivat eine deutlich antiphlogistische Wirkung nachgewiesen (TUBARO *et al.* 1988).



R = Cumaroyl

Abb. 19 : 2'',4''-Di-cumaroyl-astragalin

Tab. 4 : Vergleich der antikomplementären Wirkung von Di-cumaroyl-astragalin und seinem Di-acetyl-Derivat (CP 1)

Konzentration	Reduktion der Hämolyse in % * (CP 1)	
	2",4"-Di-cumaroyl-astragalin	3",6"-Di-acetylderivat
10^{-4} M	74,2 ± 2,6	n.t.
$5 \cdot 10^{-5}$ M	69,9 ± 2,2	-
10^{-5} M	38,2 ± 10,8	-

* Mittelwerte aus 3-5 Messungen ± S.D.

n.t. = nicht getestet

- = Hemmung ≤ 5 %

Aus den Testergebnissen können einige Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden :

- bei gleichen Substituenten im Ring B führt eine Reduktion der Doppelbindung zu einer Wirkungssteigerung
- grundsätzlich erhöht die Einführung einer Hydroxylgruppe an C₃ (Flavonol, Flavanonol) die Aktivität
- starke Hydroxylierung bzw. Methoxylierung des Ringes B vergrößert die antikomplementäre Wirkung
- eine Glykosidierung erhöht in der Flavonolreihe die Wirkung und vermindert sie in der Flavanonreihe
- eine Acylierung am Zuckeranteil glykosidierter Flavonoide ist wirkungssteigernd

3.2.2. Phenolcarbonsäuren

Ein Vertreter dieser Substanzklasse, die Rosmarinsäure, besitzt Inhibitoreigenschaften gegenüber der Klassischen sowie Alternativen C3-Konvertase (PARNHAM *et al.* 1984). Als weitere pharmakologische Wirkung wurde eine Inhibierung der Chemilumineszenz polymorphkerniger Leukozyten festgestellt (VERWEIJ-VAN VUGHT *et al.* 1987).

Getestet wurden einfach aufgebaute Phenolcarbonsäuren und ihre Ester (Abb. 20).

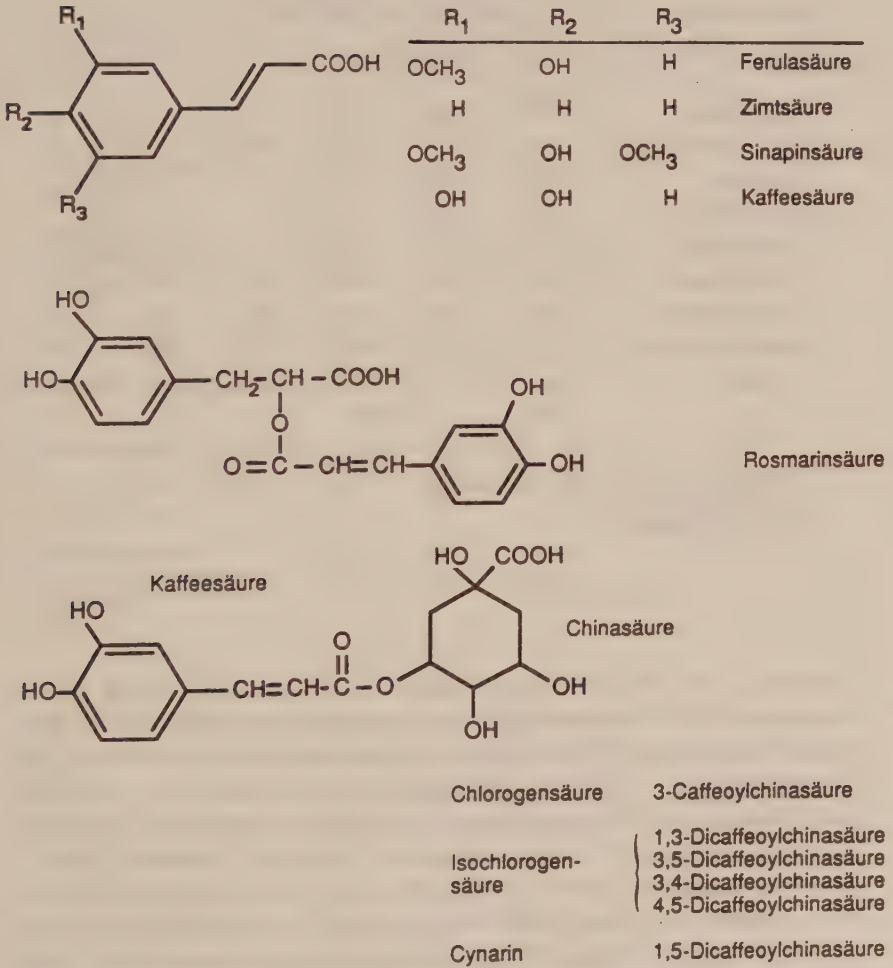


Abb. 20 : Phenolcarbonsäuren

Tab. 5: Antikomplementäre Wirkung verschiedener Phenolcarbonsäuren im Klassischen Weg (CP 1)

Konzentration	Reduktion der Hämolyse in % (CP 1)		
	10^{-3} M	$5 \cdot 10^{-4}$ M	10^{-4} M
Kaffeesäure	67,8 ± 5,8	33,1 ± 7,1	14,7 ± 1,4
Dihydrokaffeesäure	85,1 ± 1,7	35,7 ± 13,5	-
Zimtsäure	13,2 ± 1,2	-	n.t.
Ferulasäure	32,9 ± 2,1	-	n.t.
Sinapinsäure	15,4 ± 1,6	-	n.t.
Rosmarinsäure	n.t.	94,6 ± 3,5	38,8 ± 5,3
Chlorogensäure	65,2 ± 9,5	35,6 ± 9,7	8,8 ± 5,7
Isochlorogensäure	97,6 ± 3,5	93,3 ± 1,3	32,1 ± 1,2
Cynarin	n.t.	61,4 ± 9,9	25,4 ± 8,3

* Mittelwerte aus 3-7 Messungen ± S.D.

- = Hemmung < 5 %

n.t. = nicht getestet

Kaffeesäure und Dihydrokaffeesäure zeigten deutlich geringere Wirkung auf den Klassischen Weg als Rosmarinsäure. Wieder erwiesen sich die phenolischen Hydroxylgruppen als essentielles Strukturmerkmal für eine antikomplementäre Wirkung. Eine Aktivitätssteigerung war bei den Dikaffeoylchinasäuren zu beobachten, wobei nicht die Veresterung der Chinasäure, sondern die Einführung einer zweiten Kaffeesäure relevant zu sein scheint. Die zuletzt genannten Derivate der Kaffeesäure waren in ähnlichem Ausmaß im Alternativen Weg aktiv, so daß ein Angriffspunkt an C3, wie in der Literatur für Rosmarinsäure bereits bestätigt (ENGLBERGER *et al.* 1988), wahrscheinlich ist. In Testsystemen mit konzentriertem Serum konnte keine Wirkung im relevanten Konzentrationsbereich erzielt werden.

Tab. 6 : Vergleich der Komplementaktivität substituierter Kaffeesäuren in den Testsystemen CP 1 und AP 1
(prozentuale Reduktion der Hämolyse einer Kontrollreaktion)

Reduktion der Hämolyse in % *				
$5 \cdot 10^{-4}$ M				
	CP 1		AP 1	
Rosmarinsäure (GP)	94,6 ±	3,5	87,6 ±	1,1
mit NHS	72,1 ±	8,1		
Chlorogensäure	35,6 ±	9,7	42,8	*
Isochlorogensäure	93,3 ±	1,3	59,7 ±	10,3
Cynarin	61,4 ±	9,9	76,9 ±	14,4
10^{-4} M				
	CP 1		AP 1	
Rosmarinsäure (GP)	38,8 ±	5,3	50,1 ±	12,1
mit NHS	24,7 ±	7,9		
Chlorogensäure	8,8 ±	5,7		n.t.
Isochlorogensäure	32,1 ±	1,2	8,8	*
Cynarin	25,4 ±	8,3	27,8	*
$5 \cdot 10^{-5}$ M				
	CP 1		AP 1	
Rosmarinsäure (GP)	18,7 ±	1,4	34,8 ±	7,9
mit NHS				
Chlorogensäure	n.t.			n.t.
Isochlorogensäure	n.t.			n.t.
Cynarin	11,8 ±	2,9		n.t.

* Mittelwerte aus 3 Messungen ± S.D.

* wegen 1-2 Meßdaten keine Berechnung der S.D.

- = Hemmung < 5 %

n.t.: nicht getestet

Zusammenfassend ergeben sich folgende Struktur-Wirkungsbeziehungen für eine antikomplementäre Wirkung :

- durch Veretherung oder Verringerung der Zahl phenolischer Hydroxylgruppen geht die Wirkung verloren
- Hydrierung der Doppelbindungen im Acrylsäureteil führt zu einer leichten Wirkungssteigerung
- eine Veresterung mit weiteren Dihydroxybenzolresten erhöht die Aktivität entscheidend

3.2.3. Triterpene und Triterpensäuren

Bisher wurden nur drei verschiedene Phytosterine (β -Sitosterin, Stigmasterin, Campesterol) auf ihre Komplementaktivität getestet (YAMADA *et al.* 1987c). Die eingesetzte Substanzkonzentration für eine 50 %ige Reduktion der Hämolyse entsprach ca. $5 \cdot 10^{-5}$ M im Inkubationsansatz (CP2). In der zitierten Literatur bildeten sich in den Testlösungen unlösliche Präzipitate, obwohl die Lösungen mit 5 % Isopropanol hergestellt wurden. Die Komplementaktivität dieser Phytosterine könnte über eine Aktivierung durch unlösliche Partikel zustandekommen, wie dies für Polysaccharide bekannt ist (CZOP 1986). In eigenen Versuchen konnten wir β -Sitosterin bei gleicher Methodik lediglich zu 10-20 % in Lösung bringen, so daß wir auf eine Testung verzichteten.

Höher oxidierte Verbindungen wie Cucurbitacine oder einige Triterpensäuren mit β -Amyrin-Grundgerüst wiesen in 6 % DMSO bei weitem bessere Löslichkeit auf (Abb. 21). Die Screeningergebnisse im Testsystem CP 1 sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

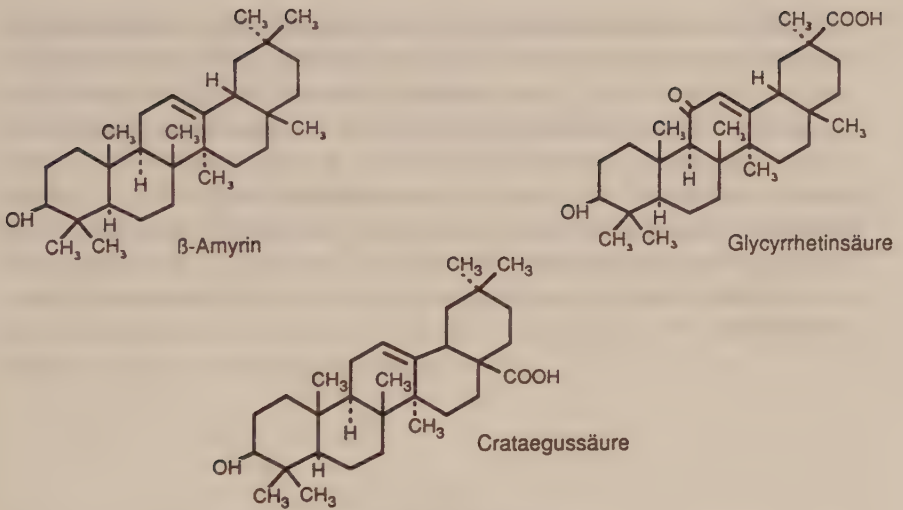


Abb. 21 : Triterpene und Triterpensäuren

Tab. 7 : Antikomplementäre Wirkung von Triterpenen, Triterpensäuren und Cucurbitacinen im Klassischen Weg (CP 1)

Konzentration	Reduktion der Hämolyse in % (CP 1)*			
	10 ⁻⁴ M		5 · 10 ⁻⁵ M	
Substanz	GP	NHS	GP	NHS
β-Amyrin	-	-		
Friedelin	-	n.t.		
Cucurbitacin I	30,1 ± 2,1	n.t.		
Glycyrrhetinsäure	65,8 ± 9,1	65,2 ± 4,7	16,6 ± 8,9	20,5 ± 3,2
Oleanolsäure	62,2 ± 24,7	+37,7 ± 7,8	25,2 ± 10,2	+39,3 ± 1,9
Quillajasäure	31,7 ± 5,9	n.t.	n.t.	n.t.
Ursolsäure	92,1 ± 8,4	+24,9 ± 13,6	91,9 ± 6,3	+42,3 ± 7,8
Crataegussäure	98,5 ± 2,3	95,1 ± 6,9	90,6 ± 6,9	+34,6 ± 6,1
Quercilicosidgenin	n.t.	n.t.	-	-

* Mittelwerte aus 3-5 Messungen ± S.D.

- = Hemmung < 5 %

n.t. : nicht getestet

Auffallend gute antikomplementäre Wirkung besaß Boswellinsäure aus dem Harz von *Boswellia serrata* Roxb., Burseraceae (PARDHY *et al.* 1978) (Tab. 8). Sie wurde in unserem Arbeitskreis isoliert, strukturell überprüft (BAUER 1986) und durch HPLC-Analyse und Schmelzpunktsermittlung (Smp.: 235°C) als β -Boswellinsäure identifiziert. In pharmakologischen Untersuchungen (SINGH *et al.* 1986, SHARMA *et al.* 1988) wurde ein Alkoholextrakt dieser schon in der Ayurvedischen Medizin u.a. bei Rheuma verwendeten Droge in verschiedenen Tiermodellen (Carrageenanödem, Dextranödem, Adjuvansarthritis, Granulomebeuteltest) untersucht. In diesen in-vivo-Testsystemen paarte sich eine ausgezeichnete antiphlogistische Wirkung mit guter gastrointestinaler Verträglichkeit.

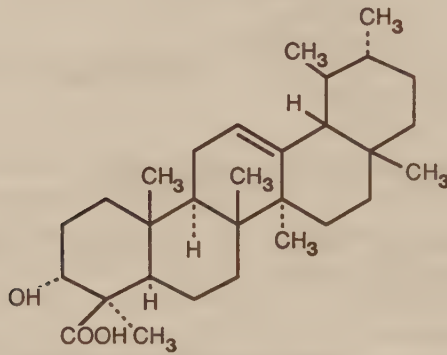


Abb. 22 : β -Boswellinsäure

Tab. 8 : Antikomplementäre Wirkung von β -Boswellinsäure im Klassischen Weg (CP1)*

(ausgedrückt als proz. Reduktion der hämolytischen Kontrollreaktion)

Serumquelle	Konzentration			
	10^{-4} M	$5 \cdot 10^{-5}$ M	10^{-5} M	$5 \cdot 10^{-6}$ M
GP	90,6 $\pm$ 5,3	85,1 $\pm$ 8,4	41,5 $\pm$ 7,7	28,3 $\pm$ 7,3
NHS	80,6 $\pm$ 6,4	85,3 $\pm$ 10,9	12,3 $\pm$ 5,4	4,4 $\pm$ 1,1

* Mittelwerte aus 3-5 Messungen $\pm$ S.D.

Die Boswellinsäure zeigte dosisabhängig bis zu einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ M im klassischen Komplementtest Aktivität. Ihre gute Wirkung konnte auch in menschlichem Serum bestätigt werden (WAGNER *et al.* 1987).

Sie zählt damit zu den potentesten, antikomplementären Substanzen dieser Reihe.

Auch im Alternativen Weg übte sie diese Wirkung aus, wobei ihr Angriffspunkt sicher nicht bei der Komponente C3 oder dem Faktor B liegt, wie die Immundefixations-Ergebnisse erkennen lassen. In einer Konzentration von 0,2 mg/40 µl NHS konnte keine nennenswerte Konvertierung von C3 und von Faktor B lediglich ein 37,0 %iger (rel.) Abbau nachgewiesen werden. In den Testsystemen mit konzentriertem Serum war keine Reduktion der Hämolyse meßbar.

Tab. 9: Antikomplementäre Wirkung von Triterpensäuren im Alternativen Weg (AP 1)

Substanz	Reduktion der Hämolyse in % * (AP 1)			
	Konzentration			
	10^{-4} M		$5 \cdot 10^{-5}$ M	
β-Boswellinsäure	90,4 ± 8,4		56,1 ± 0,9	
Ursolsäure	16,1 ± 4,6		8,9 ± 0,8	
Crataegussäure	17,9 ± 8,1		11,7 ± 0,1	
Oleanolsäure	12,1 ± 1,2		-	
Glycyrrhetinsäure	13,5 ± 2,2		-	

* Mittelwerte aus 3-5 Messungen ± S.D.

- = Hemmung < 5%

Keine Vorinkubation bei AP 1

Aus den Testergebnissen ergeben sich folgende Struktur-Wirkungsbeziehungen in der Triterpensäurereihe :

- essentielles Strukturmerkmal ist eine Carboxylgruppe
- Verbindungen mit einer Carboxylgruppe am C₄ sind in der Wirkung deutlich jenen mit Hydroxylgruppen in den Positionen C₁₇ oder C₂₀ überlegen
- Substituenten an C₁₆ schwächen bei gleichzeitiger Anwesenheit einer Carboxylgruppe an C₁₇ die Wirkung ab
- eine Hydroxylgruppe an C₂ und/oder eine primäre Alkoholgruppe an C₄ verringern die Aktivität
- die Carboxylgruppe an C₁₇ scheint für prokomplementäre Effekte in menschlichem Serum verantwortlich zu sein
- antikomplementäre Wirkung über den Alternativen Weg ist an eine Carboxylgruppe an C₄ gekoppelt

3.2.4. Sesquiterpene

Für die Sesquiterpenlactone Helenalin, Psilotropin und Parthenin konnte in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ M keine antikomplementäre Wirkung nachgewiesen werden. Von vier Sesquiterpenalkohol-Zimtsäureestern, die in unserem Arbeitskreis aus *Parthenium integrifolium* L., Asteraceae, isoliert wurden (BAUER *et al.* 1985), war Epoxyechinadiol mit $40,6 \pm 6,5$ % Hämolysehemmung des CP bei 10^{-4} M am aktivsten.

3.3. Hochmolekulare Substanzen verschiedener Herkunft

Ausgehend von Untersuchungen über sulfatiertes Carrageenan und das neutrale (1→3)-β-D-Glucan Lentinan (aus dem Pilz *Lentinus edodes* Berk.) hat man seit zwei Jahrzehnten die Wirkung von Polysacchariden auf das Komplementsystem untersucht. Ihr Wirkmechanismus konnte in den letzten Jahren aufgrund verbesserter Testmethodik genauer beschrieben werden, wobei eine endgültige Klärung infolge ihrer dosisabhängigen multifunktionellen Angriffspunkte sehr erschwert wird.

Beim Screening von Polysacchariden wurden nur reine Substanzen und hochgereinigte Fraktionen eingesetzt. Bei aktiven Polysacchariden wurden mögliche Lipopolysaccharidkontaminationen ausgeschlossen (siehe B.2.5.1.).

Bei den Untersuchungen stellte sich heraus, daß die eingesetzten Verbindungen in den vier etablierten Vorscreeningtestsystemen deutlich verschiedene Interaktionen mit dem Komplementsystem erkennen lassen. So erreichten sulfatierte Polysaccharide in den vorinkubationsfreien und mit verdünntem Serum durchgeführten Systemen CP 1 und AP 1 ihre größte Aktivität. Demgegenüber waren neutrale und uronsäurehaltige Polysaccharide nur nach Vorinkubation in konzentriertem Serum wirksam (CP 2, AP 2).

3.3.1. Sulfatierte Polysaccharide

Sulfatierte Polysaccharide spielen im Pflanzenreich vornehmlich eine Rolle als Zellwandbestandteil und Gerüstbildner der Algen, während sie im Tierreich in Bindegewebe und Knorpelsubstanz vorkommen. In marinen Organismen konnten hoch sulfatierte Polysaccharide in Sekreten, Schleim, Mantelgewebe und Muschelschalen nachgewiesen werden (HUNT 1970).

Entscheidend für viele ihrer pharmakologischen Wirkungen scheint ihr hoher Sulfatierungsgrad zu sein. Neben **antithrombotischen** und **gerinnungshemmenden** Eigenschaften, die auf eine indirekte Thrombinhemmung zurückgehen (OFOSU *et al.* 1987), wird auch über **antitumorale**, **antiarthritische** und **antivirale** Aktivität berichtet.

COOMBE konnte eine Inhibierung der Ausbreitung und Gewebearchäsion von Tumormetastasen durch intravenöse Gabe von λ -Carrageenan, Fucoidan und Heparin beobachten (COOMBE *et al.* 1987). Andere Autoren (ISHIOKA *et al.* 1987) wiesen jedoch bei oraler Gabe sulfatierter Polysaccharide ein Ansteigen der Kolonkarzinomrate nach. Der Einfluß sulfatierter Polysaccharide auf den HIV-Virus ist inzwischen durch mehrere Untersuchungen belegt. Einer ihrer Angriffspunkte ist die Reverse Transcriptase und damit die Virusreplikation. Strukturell betrachtet korrelierte die Anwesenheit von Sulfatgruppen mit der Anti-HIV Wirkung (YOSHIDA *et al.* 1988). Dabei zeigten sulfatierte Homopolysaccharide weit stärkere Inhibitoreigenschaften gegenüber der Reversen Transcriptase als die sulfatierten Heteropolysaccharide (MIZUMOTO *et al.* 1988).

Sulfatierte Polysaccharide üben Einfluß auf beide Wege der Komplementkaskade aus. Im Klassischen Weg interferieren diese polyanionischen Substanzen mit der Startkomponente C1q, einem basischen Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 9,2, durch Komplexbildung. Daneben hemmen sie durch Reaktion mit C1s den C4/C2-Verbrauch (LOOS *et al.* 1976).

Im Alternativen Weg binden sulfatierte Polysaccharide an den Faktor H, blockieren seine Regulierungsfunktion und erhöhen die C3b-vermittelte Amplifizierung (BITTER-SUERMAN *et al.* 1981). Speziell von Heparin sind noch weitere Angriffspunkte an der Kaskadenreaktion nachgewiesen, wie z.B. eine Inhibierung der C3-Konvertasebildung des AP, Potenzierung der C1-INH Wirkung (FUJII *et al.* 1984), verminderte Bindung von Immunkomplexen an CR1-Rezeptoren (JEPSEN *et al.* 1987) und Störung der Bildung des MAC-Komplexes (ASGHAR 1984).

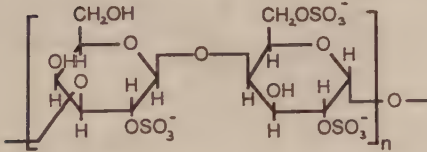
Wir untersuchten in den von uns etablierten Testsystemen die wichtigsten sulfatierten pflanzlichen Polysaccharide (λ -Carrageenan, Fucoidan), zwei verschiedene Chargen Laminarin und als Vergleichssubstanz Heparin. Da bei hochmolekularen Verbindungen die strukturelle Zusammensetzung stark variieren kann, wurden alle Testsubstanzen zuvor chemisch untersucht (Abb. 23).

Abb. 23 : Strukturtypen der getesteten sulfatierten Polysaccharide :

λ -Carrageenan :

Chondrus crispus, *Gigartina stellata* (Rhodophyceae)

(1 $\rightarrow$ 3)- β -galp-2-sulfat-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-galp-2,6-disulfat (K^+ , Na^+ , Mg^{++} -salze)

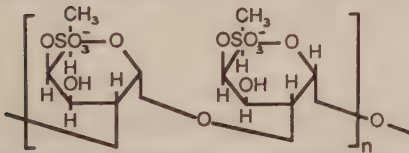


MG : ca. 2000 kD
 Neutralzucker : 39,8 % Gal
 Aminosucker : -
 Uronsäuren : 3,5 %
 Protein : < 1 %
 Sulfatgehalt : 34,0 %

Fucoidan :

Fucus-, *Laminaria*-, *Macrocystis*-Arten (Phaeophyceae)

(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-fucp-4-sulfat, Spuren von D-Xylose, D-Galactose, D-Mannose



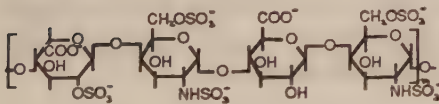
MG: 76 kD, 560 kD
 Neutralzucker: L-Fuc 1,0 D-Xyl 0,12
 (mol. Verh.) D-Man 0,07 D-Gal 0,1
 Aminosucker : -
 Uronsäuren : 2,2 %
 Protein : 2,4 %
 Sulfatgehalt : 26,1 %

Heparin Natriumsalz :

Glycosaminoglykan aus tierischen Organen

(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-idopA-2-sulfat-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glcpN-[3,6,N]-sulfat-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glcpA-(1 $\rightarrow$ 4)- α -

D-glcpN-[3,6,N]-sulfat



MG: 23 kD
 Neutralzucker : -
 Aminosucker : 20,3 %
 Uronsäuren : 27,0 %
 Protein : < 1 %
 Sulfatgehalt : 32,1 %

Laminarin :

Laminaria digitata (Phaeophyceae)
 (1→3)-β-D-glcp-(1→6)-β-D-glcp

LAM 1

MG : 220 kD, > 2000 kD
 Neutralzucker : L-Fuc 1,0 D-Glc 0,44
 (mol.Verh.) D-Man 0,37 D-Xyl 0,23
 Aminosucker : -
 Uronsäuren : 8,5 %
 Protein : 25,5 %
 Sulfatgehalt : 16,3 %

LAM 2

MG: < 10 kD
 Neutralzucker: D-Glc 1,0 D-Man 0,04
 (mol.Verh.) D-Gal 0,05
 Aminosucker: 2,12 %
 Uronsäuren: 13,25 %
 Protein: < 1 %
 Sulfatgehalt: 2,80 %

Bei dem Polyglucosid Laminarin erhielten wir von zwei Firmen sehr verschiedene Chargen (LAM 1 und LAM 2). LAM 1 stellte eine Mischung aus zwei heterogenen Polysacchariden dar und besaß einen hohen Protein- und Sulfatgehalt. LAM 2 entsprach einem niedermolekularen, nicht sulfatierten Glucan und ist als neutrales Polysaccharid anzusehen.

Die sulfatierten Polysaccharide wurden zunächst in den Testsystemen CP 1 und AP 1 mit verdünntem Meerschweinchen- bzw. menschlichem Komplement untersucht (Tab. 10). Dabei wurde bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml eine nahezu 100 %ige Verringerung der Hämolysereaktion gemessen. Die Referenzsubstanz Heparin zeigte bei weitem geringere Aktivität. Die Werte mit Meerschweinchenserum und menschlichem Serum waren vergleichbar, lediglich in der letzten Konzentration waren gewisse Abweichungen ersichtlich.

Carrageenan, Fucoidan und LAM 1 beeinflussten den Alternativen Weg 30-400fach weniger als den Klassischen (Tab. 10). Wiederum zeigten die Heparinwerte eine andere Tendenz und wiesen eine starke inhibierende AP-Aktivität auf.

Eine Testung in konzentriertem, menschlichem Serum mit Vorinkubation ergab größenordnungsmäßig Übereinstimmung mit den Resultaten des Klassischen Weges, während in AP 2 dosisabhängig teilweise prokomplementäre Effekte beobachtet wurden (Abb. 24).

Tab. 10 : Antikomplementäre Wirkungen sulfatierter Polysaccharide im Klassischen und Alternativen Weg (CP 1, AP 1)
(Ausgedrückt als reduz. Hämolyse in % *)

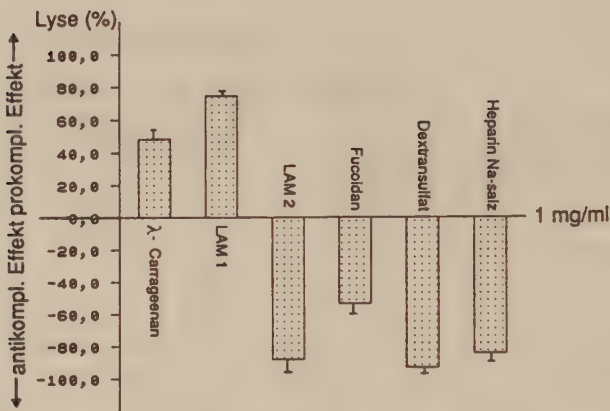
Reduktion der Hämolyse in % *				
		Klassischer Weg (CP 1)	Alternativer Weg (AP1)	
Polysaccharid	Konz. (µg/ml)	GP (1:700)	NHS (1:250)	NHS (1:18)
λ-Carrageenan	1000	97,4 ± 0,7	98,1 ± 0,2	81,1 ± 13,7
	100	96,1 ± 0,7	97,3 ± 0,1	29,1 ± 23,4
	10	94,9 ± 3,1	91,2 ± 1,3	35,2 ± 0,4
	1	41,2 ± 41,1	2,1 ± 1,2	-
Fucoidan	1000	98,1 ± 0,6	96,1 ± 0,3	89,2 ± 9,3
	100	94,9 ± 1,1	92,8 ± 2,1	6,5 ± 4,9
	10	96,3 ± 1,3	33,3 ± 7,4	n.t.
Heparin	1000	95,1 ± 1,5	52,8 ± 7,3	94,6 ± 0,9
Natriumsalz	100	46,8 ± 10,1	25,9 ± 11,5	40,8 ± 26,2
	10	4,7 ± 5,8	n.t.	23,1 ± 20,6
Laminarin 1 (LAM 1)	1000	96,1 ± 0,7	95,1 ± 1,2	56,1 ± 2,7
	100	95,1 ± 0,1	88,1 ± 7,5	3,3 ± 0,4
	10	93,8 ± 3,4	7,6 ± 6,3	-
Laminarin 2 (LAM 2)	1000	-	-	-
Chondroitinsulfat	1000	8,7 ± 3,2	n.t.	-

* Mittelwerte aus 3-7 Messungen ± S.D.

- = Hemmung < 5 %

n.t.: nicht getestet

Abb. 24 : Einfluß sulfatierter Polysaccharide auf den Alternativen Weg nach Vorinkubation (CP 2)



Exemplarisch führten wir für das Polysaccharid Fucoidan Einzelkomponenten-Testungen durch. Dabei konnten wir bei einer Konzentration von 0,6 mg/500 μ l (0,06 mg im Testansatz) eine starke Bindung der Substanz an die Komponente C1q feststellen, die auch bei zweifach erhöhter Ionenstärke Bestand hatte.

Die Art dieser Bindung ist temperaturabhängig; bei Temperaturen um 0°C findet nur eine Komplexierung von C1q statt, während bei 37°C nach neueren Erkenntnissen gleichzeitig die Klassische Komplementreaktion gestartet wird (LOOS 1982).

Fucoidan erwies sich in der Immunfixation unter den gewählten Testbedingungen als starker Aktivator des Faktors B. In einer Konzentration von 170 μ g/40 μ l NHS konvertierte das Polyanion den Faktor B zu $74,3 \pm 4,3$ % (94,8 % rel.) in seine Spaltprodukte, während die Komponente C3 nur zu $26,7 \pm 6,5$ % (44,8 % rel.) abgebaut wurde.

Unsere Ergebnisse werden durch Untersuchungen von BAKER bestätigt, der eine Aktivierung des Komplementsystems durch Carrageenan postuliert (BAKER *et al.* 1986). Auch die Fähigkeit zur Carrageenan-induzierten Ödembildung in dem bekannten Rattenpfoten-Tiermodell weist eher auf ein intaktes, aktiviertes Komplementsystem als auf eine Inhibierungsreaktion hin.

3.3.2. Neutrale Polysaccharide

Für einige neutrale Polysaccharide z.B. Lentinan wird eine immuninduzierte Tumortoxizität beschrieben. Sie soll durch eine Aktivierung des retikuloendothelialen Systems und des Komplementsystems zustande kommen. Man nimmt an, daß Oberflächenantigene von Tumorzellen mit zytotoxischen Antikörpern reagieren und den klassischen Komplementweg aktivieren. Die entscheidende Folge­reaktion wäre nicht die Lyse dieser Zellen, da kernhaltige Zellen Schäden der Zellwand durch Reparaturmechanismen beheben können, sondern eine Erhöhung der Phagozytoserate durch aktivierte Makrophagen, die mittels zellgebundenem C3b vermittelt wird. Steigende C3b-Spiegel können über eine Alternative Aktivierung am schnellsten erreicht werden.

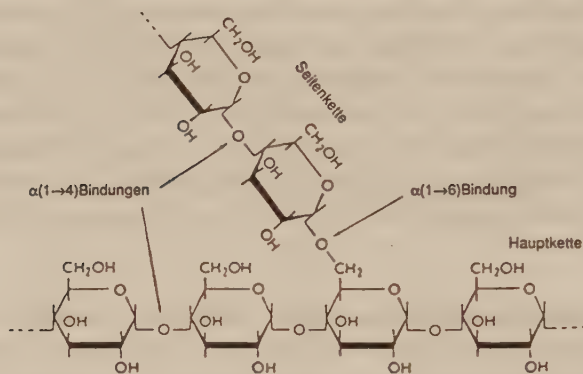
Bei neutralen Polysacchariden zeigte sich eine Korrelation der antikomplementären in-vitro-Aktivität über den Alternativen Weg mit der Inhibierung des Tumorstwachstums im Sarkom 180-Tiermodell. Dabei erwiesen sich an C₆ verzweigte (1→3)-β-D-Glucane als besonders wirksam (OKUDA *et al.* 1972). Bei Untersuchungen über Struktur-Wirkungsbeziehungen von Polysacchariden nach chemischer Modifikation stieg sowohl die Antitumor- als auch die Antikomplement-Aktivität (in bezug auf den Alternativen Weg) saurer Polysaccharide durch Abspaltung der sauren Gruppen an (YAMADA *et al.* 1986).

Da bisher vor allem (1→3)-β-D-Glucane auf ihre Komplementwirksamkeit untersucht wurden, testeten wir in den Systemen CP 2 und AP 2 mit konzentriertem Serum und nach Vorinkubation tierische und pflanzliche Glucane anderer Verknüpfungsart und aus Pflanzen isolierte, neutrale Heteropolysaccharide.

Dabei handelte es sich um Glykogene unterschiedlichen Ursprungs (aus der Miesmuschel und der Auster, sowie aus Kaninchenleber). Als Vergleich diente Amylose, ein lineares (1→4)-α-D-Glucan und das bekannte (1→3)-β-D-Glucan Lentinan aus dem Pilz *Lentinus edodes* Berk.

Die Vertreter der aus Pflanzen isolierten, neutralen Polysaccharide waren ein Xylogalaktoglucan aus Zellkulturen von *Arnica montana*, Asteraceae, (PUHLMANN 1989) und ein stark verzweigtes Glucan aus den Wurzeln von *Urtica dioica*, Urticaceae (WILLER).

Abb. 25 : Strukturtypen neutraler Polysaccharide des Screenings



Glykogen : $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-glcp-(1}\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-glcp}$, verzweigt $(1\rightarrow6)\text{-}\alpha\text{-D-glcp}$
 MG : $10^4\text{-}10^6$ kD

Amylose : $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-glcp}$ linear
 MG : ca. 150 kD

Lentinan : $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glcp-(1}\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glcp}$, verzweigt $(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-glcp}$
 MG : ca. 10^3 kD

Arnika : Glc 35,1 %, Xyl 15,4 %, Gal 11,7 %
 PS (A I) MG : 22,5 kD

Urtica : $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-glcp-(1}\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-glcp}$, verzweigt $(1\rightarrow6)$ und $(1\rightarrow3)$,
 RP 1 5 % Gal
 MG : 15 kD

Die Resultate des Screenings sind in Tab. 11 aufgeführt.

Tab. 11 : Antikomplementäre Wirkung neutraler Polysaccharide auf den Klassischen und Alternativen Weg (CP 2, AP 2)

Polysaccharid	Reduktion der Hämolyse in % *			
	Konz.:	1 mg/ml	0,1 mg/ml	
	CP 2	AP 2	CP 2	AP 2
Amylose	15,1 ± 3,1	99,1 ± 0	-	86,5 ± 9,8
Glykogen Miesmuschel	80,8 ± 4,4	95,9 ± 2,9	10,1 ± 0,1	55,1 ± 41
Glykogen Auster	13,2 ± 7,2	63,6 ± 23	-	2,1 ± 1,1
Glykogen Kaninchenleber	-	93,8 ± 6,8	-	4,1 ± 2,6
Arnika PS (A I)	55,5 ± 4,6	27,1 ± 0,5	41,6 ± 4,2	-
Urtica RP 1	99,3 ± 0,4	95,2 ± 3,1	91,5 ± 7,4	n.t.
Lentinan	81,9 ± 5,7	92,5 ± 2,5	27,6 ± 6,1	93,1 ± 0,6

* Mittelwerte aus 3-4 Messungen ± S.D.

- = Hemmung < 5 %

n.t.: nicht getestet

CP 2 : Testsystem Klassischer Weg mit Vorinkubation

AP 2 : Testsystem Alternativer Weg mit Vorinkubation

Die erstmals untersuchten (1→4)- α -D-Glucose aktivierten den Alternativen Weg, wobei die unverzweigte Amylose mit ihrem niedrigeren Molekulargewicht am wirksamsten war. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Glykogenen sind wahrscheinlich durch den Verzweigungsgrad bedingt. Die noch nicht strukturell vollständig aufgeklärten Polysaccharide aus Pflanzen zeigten in beiden Wegen des Komplements gute Aktivität. Ihr gemeinsames Merkmal ist das relativ kleine Molekulargewicht um 20000 D.

Konfiguration und Verknüpfungsart der Zucker scheinen eine wichtige Rolle in der antikomplementären Wirkung zu spielen. Am Beispiel des unwirksamen (1→4)- β -D-Glucose Cellulose (CZOP 1986) im Vergleich zu den (1→4)- α -D-Glucosen wird der Einfluß der Verknüpfungsart deutlich. In eigenen Untersuchungen konnten wir keinerlei Komplementaktivität für (1→6)- α -D-Glucose (Dextrane) unterschiedlichen Molekulargewichts finden. Gegenüber den (1→4)- α -D-Glucosen sind jedoch die (1→3)- β -D-Glucose in ihrer Wirkungsstärke überlegen.

Bei einer Umrechnung der Konzentrationen in Tab. 11 auf den Inkubationsansatz des Testsystems AP 1 (Faktor 2,2, bezogen auf die Serumverdünnung) und einer vorschalteten Vorinkubation konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Da alle getesteten Substanzen keinerlei Wirkung ohne Vorinkubation aufwiesen, kann ein aktivierender Mechanismus unter Komplementverbrauch angenommen werden.

Als ein Vertreter der neutralen Polysaccharide wurde das Glykogen der Miesmuschel (*Mytilus edulis*) einer orientierenden Immunelektrophorese bezüglich des Faktors C3 unterworfen. Im Vergleich zu den unwirksamen Dextranen war eine deutliche, dem Inulin entsprechende, verlängerte Präzipitationsbande durch die C3-Abbauprodukte sichtbar (B.2.6.)

Das wirksamste (1→4)- α -D-Glucose in diesem Screening, die Amylose, wurde nach Inkubation in menschlichem Serum in Immunfixationstesten auf Interaktionen mit der Komponente C3 und dem Faktor B untersucht. Dabei trat eine C3-unabhängige Konvertierung des Faktors B zu $36,4 \pm 3,1$ % (46,5 % rel.) bei einer Konzentration von 180 μ g/40 μ l NHS auf.

Diese beiden Immunelektrophoresen geben erste genauere Hinweise auf eine Rolle dieser Polysaccharide als Aktivatoren des Alternativen Weges des Komplementsystems.

3.3.3. Uronsäurehaltige Polysaccharide

In letzter Zeit wurden aus Pflanzen Polysaccharide mit unterschiedlichem Uronsäuregehalt isoliert und bezüglich ihres Einflusses auf das Komplementsystem untersucht. Der hohe Anteil von Carboxylgruppen ist für die antikomplementäre Wirkung über den klassischen Weg essentiell, wie Studien über partiell veresterte saure Polysaccharide belegen (YAMADA *et al.* 1986).

Die von uns getesteten, galakturonsäurehaltigen Polysaccharide wurden ausschließlich in unserem Arbeitskreis isoliert. Eine Aufstellung ihrer Herkunft und strukturellen Merkmale folgt in diesem Zusammenhang.

Arnika Polysaccharide : (PUHLMANN 1989)

Aus den oberirdischen Teilen von *Arnica montana*, Asteraceae

- A hb. Fr. : hoch gereinigte saure Fraktion
Galakturonsäure : 66,5 %
Neutralsucker : ca. 10 %
Protein : 1,5 %
- A hb. 1 : Pektin mit 100 % GalA, zu 60 % verestert
Protein < 1 %
MG 1820 D

Aus der Zellkultur von *Arnica montana*

- A II : Arabino-3,6-galaktan (38,8 % Gal, 24,4 % Ara)
Galakturonsäure : 18,0 %
Protein : 6,3 %
MG 100 kD

Achyrocline Polysaccharide : (PUHLMANN 1989)

Aus den oberirdischen Teilen von *Achyrocline satureioides*, Asteraceae

- AS 4 : Heteroglykan (11,5 % Gal, 7,0 % Rha, 5,9 % Ara, 6,3 % Xyl)
Galakturonsäure : 66,4 %, davon 48 % verestert
Protein < 1 %
MG 15 kD
- AS 3 : analog AS 4, MG 7600 D
- AS 1 : Xylan mit 7,5 % 4-O-Methylglucuronsäure
Protein < 1 %
MG 43 kD

Mistelpolysaccharid : (JORDAN *et al.* 1986, WAGNER *et al.* 1988a)Aus den Beeren von *Viscum album*, Loranthaceae

- Fb : Arabino-3,6-galaktan (30,3 % Ara, 20 % Gal, 1,3 % Rha)
Galakturonsäure : 12 %
Protein < 1 %
MG 700 kD

Brennesselpolysaccharid : (WILLER)Aus der Wurzel von *Urtica dioica*, Urticaeae

- Urtica RP 2 : 86,9 % Glc, 5,2 % Gal, andere Neutralzucker in Spuren
Uronsäuregehalt quant. noch nicht bekannt
Protein < 1 %
MG 50 kD

Die Screeningresultate im Klassischen und Alternativen Weg (CP 2, AP 2) sind in Tab. 12 aufgelistet.

Die einzelnen Polysaccharide zeigten ein sehr unterschiedliches Wirkungsspektrum.

Das Pektin aus *Arnicae herba* (Ahb.1) mit sehr niedrigem Molekulargewicht wies zwar noch gute Aktivität im Alternativen Weg auf, nicht jedoch im Klassischen. Da es aus der Arnica-Fraktion isoliert wurde, scheint ein anderer Bestandteil dieser Mischfraktion für die Aktivität im Klassischen Weg verantwortlich zu sein. Bei Untersuchungen an anderen Pektinen (*Viscum album*, JORDAN 1985) wurde bei einer Konzentration von 1 mg/ml auch im Alternativen Weg keine Wirkung festgestellt. Es handelte sich dabei um ein enzymatisch hydrolysiertes, unverestertes Pektin und das veresterte Ursprungspektin mit 60 % Galakturonsäure.

Sehr starke, antikomplementäre Wirkung auf beide Komplementwege übte das saure Heteroglykan von *Achyrocline* aus. Das Molekulargewicht hat offenbar keinen Einfluß, da das monomere AS 3 ähnlich gute Wirkung zeigte (nicht aufgeführt). In vivo wurde von einer Reduktion des Rattenpfotenödems durch Wasserextrakte von *Achyrocline* berichtet (SIMOES *et al.* 1988), die auch bei Untersuchungen mit AS 4 bestätigt werden konnte (PUHLMANN 1989).

Polysaccharide mit geringerem Uronsäureanteil wie A II aus der Arnika Zellkultur oder Fb aus Mistelbeeren waren größtenteils im Alternativen Weg aktiv. AS 1, ein 4-O-methylglucuronsäurehaltiges Xylan, war jedoch in einer Konzentration von 1 mg/ml unwirksam.

Tab. 12 : Antikomplementäre Aktivität uronsäurehaltiger Polysaccharide im Klassischen und Alternativen Weg (CP 2, AP 2)

Reduktion der Hämolyse in % *			
Polysaccharid	Konz. ($\mu\text{g/ml}$)	Klassischer Weg CP 2	Alternativer Weg AP 2
Arnicae herba	1000	90,7 $\pm$ 0,8	67,3 $\pm$ 7,2
Fraktion	100	38,8 $\pm$ 12,9	n.t.
	10	n.t.	n.t.
Arnicae herba PS	1000	-	63,7 $\pm$ 14,8
(Ahb. 2)	100	-	15,1 $\pm$ 13,3
	10	n.t.	-
Arnika Zellkultur	1000	7,7 $\pm$ 6,7	98,3 $\pm$ 0,5
PS (A II)	100	n.t.	92,7 $\pm$ 7,1
	10	n.t.	35,1 $\pm$ 5,3
Achyrocline PS	1000	97,1 $\pm$ 0,5	87,3 $\pm$ 0,5
(AS 4)	100	93,1 $\pm$ 0,4	69,6 $\pm$ 18,2
	10	38,1 $\pm$ 9,6	24,3 $\pm$ 5,5
Mistel PS	1000	51,7 $\pm$ 22,8	85,2 $\pm$ 11,1
(Fb)	100	-	59,1 $\pm$ 4,9
	10	n.t.	12,3 $\pm$ 13,6
Urtica RP 2	1000	95,5 $\pm$ 2,1	99,5 $\pm$ 0,7
	100	86,2 $\pm$ 4,9	97,4 $\pm$ 3,7
	10	32,6 $\pm$ 8,1	n.t.

* Mittelwerte aus 3-6 Messungen $\pm$ S.D.

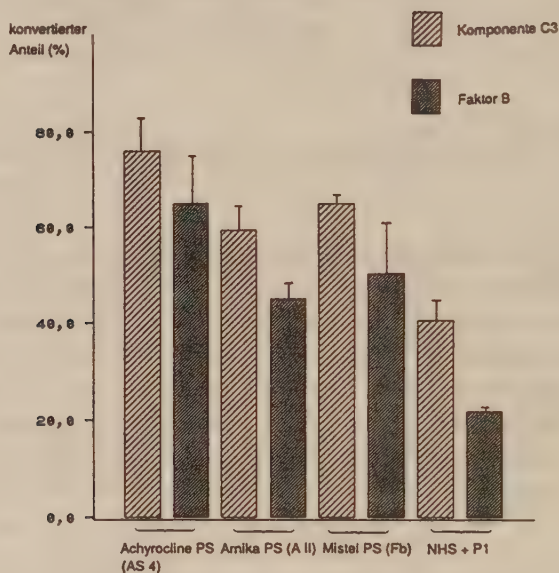
- = Hemmung < 5 %

n.t.: nicht getestet

Das strukturell noch nicht vollständig aufgeklärte, glucosereiche *Urtica*-Polysaccharid scheint nach den ersten Screeningergebnissen eine hochpotente Substanz in CP 2 und AP 2 zu sein. Alle getesteten Polysaccharide zeigten keine Wirkung bei verdünntem Serum (CP1, AP 1) oder bei Testungen ohne Vorinkubation.

Die Ergebnisse der Immunfixation der Komponente C3 und des Faktors B sind in Abb. 26 dargestellt (Konz. im Test : 160 µg/40 µl NHS).

Abb. 26 : Aktivierende Einflüsse galakturonsäurehaltiger Polysaccharide auf die Komponente C3 und den Faktor B



Sowohl die Komponente C3 als auch der Faktor B wurden von den sauren Polysacchariden AS 4, A II und Fb beeinflusst. Der höchste Anstieg von Peptidfragmenten wurde bei dem Pektin aus Achyrocline (AS 4) gefunden. Damit wurde eine Aktivierung des Alternativen Weges nachgewiesen.

Allgemein kann gesagt werden, daß die Komplementaktivität uronsäurehaltiger Polysaccharide eine starke strukturelle Abhängigkeit aufweist. Ihr Wirkungsmechanismus bedarf noch genauerer Abklärung. Erste Hinweise unserer Untersuchungen deuten auf aktivierende Interaktionen an mehreren Stellen der Kaskade hin, wobei das Verhalten von Einzelkomponenten des Klassischen Weges überprüft werden muß.

3.4. Diskussion

3.4.1. Diskussion der Screeningergebnisse

Die verwendeten Gesamtkomplementtestsysteme eignen sich nach den vorliegenden Ergebnissen für das Screening von Naturstoffen, wenn diese in reiner bzw. hochgereinigter Form vorliegen. Komplementtestergebnisse von Pflanzenrohextrakten oder isolierten Substanzgemischen müssen mit Vorbehalt betrachtet werden, da über unspezifische bzw. additive Wirkungen eine Komplementaktivität vorgetäuscht werden kann. Die Testsysteme waren außerdem gegenüber bestimmten Lösungsmitteln oder zytotoxischen Effekten empfindlich.

In mehreren Substanzklassen, vor allem bei **Triterpensäuren** und **Polysacchariden**, konnten komplementaktive Naturstoffe aufgefunden und Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden.

Eine genaue Abklärung erzielter antikomplementärer Wirksamkeit mit Hilfe von Einzelkomponenten-Titrationen oder immunoelektrophoretischer Detektion ist jedoch unbedingt notwendig, wenn exakte Aussagen über den Angriffspunkt und den Mechanismus aktiver Substanzen gemacht werden sollen.

Bei aktivierenden Polysacchariden konnte eine gute Korrelation zwischen Gesamtkomplement- und Immunfixationsergebnissen hergestellt werden.

Hemmende Einflüsse, wie wir sie bei einigen niedermolekularen Drogeninhaltsstoffen (**Di-cumaroyl-astragalin**, **β -Boswellinsäure**) vermuten, könnten durch Molekulartitration mit Einzelkomponenten nachgewiesen werden. Dieses komplexe, zeitaufwendige Verfahren wurde bei Pflanzeninhaltsstoffen bisher lediglich bei Rosmarinsäure (ENGLBERGER *et al.* 1988) oder Plicatinsäure (GICLAS 1982) mit einigen Komponenten durchgeführt.

3.4.2. Relevanz der in-vitro-Komplementaktivitäten für die Therapie

Die Entwicklung und der Einsatz von in-vitro-Komplementtestsyste-men sollte der erste Schritt auf der Suche nach aktiven Inhibitoren und Aktivatoren der Kaskadenreaktion sein.

Durch dieses Vorscreening kann, bei gleichzeitiger Reduktion der Tierversuchszahl, eine große Anzahl von Substanzen zeit- und kostengünstig getestet werden. Für genauere, therapierelevante Aussagen müssen in-vivo-Testungen an Tiermodellen, die komplementvermittelte Krankheiten wie eine Frossmanreaktion, Arthusreaktion und Glomerulonephritis simulieren, erfolgen.

Wegen hoher Toxizität oder zu geringer Plasmakonzentrationen sind bisher nur wenige komplementaktive Substanzen in die Therapie eingeführt. Dazu gehören ϵ -Aminocaprinsäure und Suramin, mit denen Erfolge beim hereditären angioneuroti-schen Ödem (angeborener C1-INH Mangel) erzielt wurden.

Obwohl unsere Ergebnisse und Literaturdaten eine aktivierende Rolle der sulfatierten Homopolysaccharide belegen, wurden diese bereits mit Erfolg bei Polyarthritis eingesetzt (KRUZE *et al.* 1976). Eine rheumatologische Untersuchung erklärt diese Wirkung immunstimulierender Substanzen in der rheumatischen Arthritis über die Bekämpfung der Immunschwäche, die die entzündungsauslösende, persistierende Infektion begleitet (BAENKLER 1981).

Ein Einsatz von Komplementinhibitoren in der Therapie wird sich durch die starken immunsuppressiven Wirkungen dieser Substanzen auf eine symptomatische Kurzzeit-therapie wie z. B. beim Dengue Fieber (BOKISCH *et al.* 1973) beschränken müssen. Inwieweit Pflanzenextrakte und isolierte, aktive Drogeninhaltsstoffe bei Krankheits-bildern, deren pathophysiologische Auswirkungen eng mit dem Komplementsystem verbunden sind, eine Rolle spielen können, müssen weitergehende, zukünftige in - vivo-Untersuchungen und klinische Studien zeigen.

C. Perna canaliculus

Chemische und pharmakologische Untersuchungen der neuseeländischen Muschel *Perna canaliculus* (Gmelin)

1. **Kenntnisstand über *Perna canaliculus***

1.1. **Pharmakologie und Anwendung in der Volksmedizin**

Die grünlippige Neuseelandmuschel wird in Form eines Trockenextraktes von einigen Firmen als symptomlinderndes Adjuvansmittel bei entzündlichen, arthritischen Erkrankungen vertrieben. Dieser Trockenextrakt soll bei oraler Verabreichung nach längerer Einnahmezeit von ca. 1000 mg Tagesdosis Schmerzen und Steifheit der Gelenke verringern.

In einem antiphlogistischen Standardmodell, der in-vivo-Hemmung des Rattenpfotenödems, wurde bei intraperitonealer Gabe von 500 mg Extrakt/kg Ratte eine signifikante Abnahme des Ödemvolumens gemessen (MILLER *et al.* 1980). Im Gegensatz zu einer Untersuchung von RAINSFORD und Mitarbeitern (1980) konnte MILLER aber bei oraler Gabe keine Wirksamkeit feststellen (MILLER *et al.* 1980). Aufgrund von Untersuchungen, durchgeführt mit zwei Tiermodellen, wird angenommen, daß der Extrakt die Prostaglandinsynthese zu hemmen vermag (MILLER *et al.* 1984, KOSUGE *et al.* 1985).

In klinischen Studien wurden bei adjuvanter oraler Gabe des Muschelextraktes zu einer bestehenden Therapie zwei divergierende Ergebnisse festgestellt : zum einen bei sechsmonatiger Anwendung eine deutliche Verbesserung der arthritischen Symptome (GIBSON *et al.* 1980), im anderen Falle keine signifikante Veränderung des Status nach sechswöchiger Gabe (CAUGHEY *et al.* 1983).

1.2. **Systematik, Vorkommen und Beschreibung der Muschel**

Die Muscheln (*Bivalvia*) gehören innerhalb der Invertebraten zur Klasse der Mollusken. Es gibt ca. 20000 Arten dieser wasserlebenden Weichtiere. Ihr bilateral-symmetrischer Körperbau wird von einer harten, zweiklappigen Schale umschlossen.

Der Weichkörper besteht zu 84 % aus Wasser neben 10 % Protein, 1,7 % Kohlehydraten und 1,6 % Fett. Die Gewebsflüssigkeit (ca. 55 % des Weichkörpers), die sogenannte Hämolymphe, besitzt eine in ihrer Ionenkonzentration dem Standortmilieu angepaßte Zusammensetzung. Charakteristisch ist ein hoher Chlorid- und Sulfatgehalt (NICOL 1960). In ihrer Funktion als Blutersatz enthält die meist neutrale Hämolymphe die Atmungspigmente Hämoglobin oder Hämocyanin. Die Muscheln verfügen über einen ausgeprägten "Aufbau-Ruhe-Zyklus", der mit der sexuellen, reproduktiven Aktivität gekoppelt ist (GÖTTING 1974).

Systematische Einteilung der grünlippigen Neuseelandmuschel Perna canaliculus (Gmelin) :

Klasse : Bivalvia, Ordnung : Filibranchia, Unterordnung : Anisonyaria,
Überfamilie : Mytiloidae, Familie : Mytilidae, Gattung : Perna
Art : Perna canaliculus

Perna canaliculus ähnelt - abgesehen von ihrer grünlichen Randfärbung - im Aussehen der Miesmuschel, die ebenfalls der Familie der Mytilidae angehört. Ihr Vorkommen beschränkt sich auf die Küsten Neuseelands, wo sie wild wächst oder in Meeresfarmen kultiviert wird.



Abb. 27 :
Perna canaliculus (GMELIN)

1.3. Bisher bekannte Inhaltsstoffe

Laut Firmenangaben (McFarlane Lab. Limited, Auckland NZ) besteht der lyophilisierte Reineextrakt des Weichkörpers aus 50 % Protein, 20 % Kohlehydraten, 17 % Lipid und einer nicht genauer bestimmten Menge von Glykosaminoglykanen.

Bisher gab es nur vage Hinweise auf Inhaltsstoffe, die die Anwendung dieser Muschel in der Erfahrungsmedizin erklären könnten.

So berichtete COUCH 1982 über eine pharmakologisch wirksame, nicht näher charakterisierte Substanz des hochmolekularen, hydrophilen Anteils des Muschellyophilisats. In einer Untersuchung des Lipidanteils wurden 14 bekannte Sterole identifiziert, die aber über keine entzündungshemmende Potenz verfügten (WESTON 1983). Aus dem Methanolextrakt des Muschelpulvers konnte 1986 ein "antihistaminisch" wirksames Lyssolezithin isoliert werden (KOSUGE *et al.* 1986).

2. Die Suche nach dem antiphlogistischen Wirkprinzip von *Perna canaliculus*

Eine Übersicht über niedermolekulare Inhaltsstoffe in marinen Organismen und ihrer pharmakologischen Aktivitäten existiert von BAKER und Mitarbeitern (1981). Als interessante hochmolekulare Substanzen erwiesen sich bei den Invertebraten Lektine unterschiedlicher Spezifität (UHLENBRUCK *et al.* 1976, RENWRANTZ *et al.* 1982) und sulfatierte Polysaccharide. Während bei den Invertebraten sulfatierte Glucane und Galaktane als Bestandteil von Schleim und Sekreten überwiegen (HUNT 1970, MOURAO *et al.* 1987, ALBANO *et al.* 1986), wurden aus verschiedenen Algenspezies sulfathaltige Fucane isoliert (HUNT 1970, NISHINO *et al.* 1988, NAGUMO *et al.* 1988, KLOAREG *et al.* 1986).

Da unter den Polysacchariden eine Reihe von antiphlogistisch wirkenden Verbindungen bekannt sind (GIROUD *et al.* 1973, HARA *et al.* 1982, KIHIO *et al.* 1985), und diese Wirkung mit einer antikomplementären Aktivität korrelieren kann (DI ROSA *et al.* 1971, TIMSIT *et al.* 1980), war es naheliegend, in dieser Stoffklasse nach pharmakologisch aktiven Verbindungen zu suchen.

Für das Screening auf biologische Aktivität von isolierten Fraktionen und Reinsubstanzen des Pernaextraktes wurden die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Gesamtkomplement-Testsysteme eingesetzt.

3. "Bioguided Fractionation" von Pernaextrakten

3.1. Ausgangsmaterialien

Da ein direkter Bezug frisch gesammelter Muscheln aus Neuseeland transport-technisch nicht möglich war, verwendeten wir als Ausgangsmaterial einen lyophilisierten Weichkörperextrakt, der zunächst in Form der im Handel befindlichen Monopräparate* dann über den Generalimporteur der Fa. McFarlane, Auckland, Neuseeland, bezogen wurde. Neben diesen lyophilisierten Chargen aus *Perna canaliculus* wurden auch Extrakte der bei uns weit verbreiteten Miesmuschel und der Auster zu Vergleichszwecken untersucht.

Verwendete Muscheln :

Perna canaliculus (Gmelin), Mytilidae : grünlippige Neuseelandmuschel

Mytilus edulis (Linné), Mytilidae : Miesmuschel

Crassostrea angulata (Lamarck), Ostreidae : Auster

Die Extraktbereitung lebender Muscheln erfolgte nach manueller Öffnung der Schalen durch schonende Lyophilisierung und Zerkleinerung der Weichkörper.

3.2. Isolierung von Protein-Polysaccharid-Rohfraktionen

Nach HUNT (1970) sind sulfatierte Polysaccharide aus Invertebraten oft mit Proteinanteilen assoziiert. Neben lockerer Aggregatbildung treten auch alkalistabile Glykoproteine auf. Wir wählten daher einen Isolierungsgang, der sowohl der Proteinnatur als auch der Isolierung saurer Polymerer Rechnung trug (Abb. 28).

* "Seatone®" und "Seatone forte®", Fa. McFarlane Lab., Auckland, Neuseeland

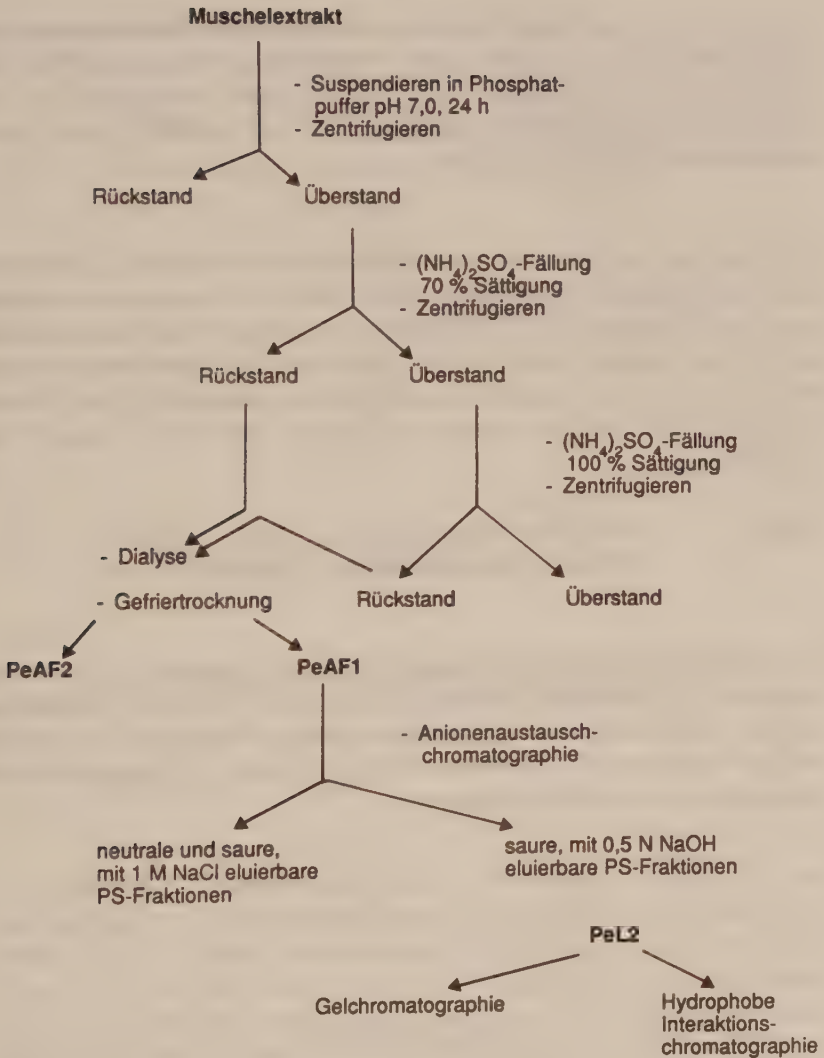


Abb. 28 : Isolierungsschema des Glykoproteins PeL2 aus dem Trockenextrakt Perna 1 der Muschel *Perna canaliculus*

Das Muschelpulver Pernaextrakt 1 wurde mit Aceton entfettet und anschließend mit einem zwanzigfachen Überschuß eines physiologischen Natriumchlorid-Phosphat-Puffers extrahiert. Die Suspension wurde bei 8°C einen Tag gerührt und der ungelöste Rückstand hochtourig abzentrifugiert. Mit dem Überstand wurden sofort **Ammoniumsulfatfällungen** durchgeführt.

In Vorversuchen wurde durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Ammoniumsulfat die geeignete Fraktionierungsmethode ermittelt. Im Hauptversuch arbeiteten wir mit einer 70 %igen und 100 %igen Sättigungskonzentration. Nach Abtrennung des bei 70 %iger Sättigung erhaltenen Präzipitates wurde mit dem Überstand eine Fällung mit 100 %iger Ammoniumsulfatkonzentration durchgeführt. Beide Niederschläge wurden in destilliertem Wasser aufgenommen, gegen Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

Ausbeute :	70 %ige Ammoniumsulfatfällung :	PeAF1 ca. 1,42 %
	100 %ige Ammoniumsulfatfällung :	PeAF2 ca. 0,48 %

Die lyophilisierten Ammoniumsulfatfällungen zeigten im Testsystem CP 1 keinerlei Zytotoxizität auf sensibilisierte Hammelerythrozyten, übten aber auf den Klassischen Weg des Komplementsystems eine **antikomplementäre Wirkung** aus. Die deutlich aktivere Fraktion der "70 % Fällung" (Tab. 13) wurde zur Anreicherung und Reinigung des aktiven Prinzips herangezogen.

Tab. 13 : Antikomplementäre Aktivität der Ammoniumsulfatfällungen

Fällung	Konzentration	Reduktion der Hämolyse in % (Testsystem CP 1)
PeAF1	1,0 mg/ml	94,5 ± 1,4
	0,1 mg/ml	37,9 ± 0,2
	0,05 mg/ml	6,5 ± 0,1
PeAF2	1,0 mg/ml	94,3 ± 0,3
	0,1 mg/ml	-
	0,05 mg/ml	-

* Mittelwerte aus 2-3 Messungen ± S.D.

- = Hemmung < 5 %

3.3. Anionenaustauschchromatographie der Ammoniumsulfatfällungen

3.3.1. Darstellung der Fraktion PeL2

Die Auftrennung der Ammoniumsulfatfällung PeAF1 erfolgte an einem schwachen Anionenaustauscher (DEAE-Sephrose®CL-6B) in der Acetatform. Hierzu wurde das Präzipitat der 70 % Ammoniumsulfatsättigung in Phosphatpuffer gelöst. Der Neutralteil wurde in zwei Fraktionen unterschiedlichen Molekulargewichtes mit positiver optischer Drehung (PeN1, PeN2) getrennt. Die Elution der gebundenen Fraktionen erfolgte durch einen linearen 0 - 1,0 M NaCl-Gradienten in Phosphatpuffer. Bei einer Salzkonzentration von 0,2 - 0,3 M NaCl wurde eine rechtsdrehende Fraktion (PeA1) und bei Salzkonzentrationen im Bereich von 0,5 - 0,75 M NaCl zwei Fraktionen mit negativer optischer Aktivität (PeA2) abgelöst. Um eine vollständige Desorption gebundener Substanzen zu erhalten, wurde die Säule anschließend mit 0,5 N Natronlauge gespült.

Dabei konnten bei pH-Werten von 6,5 (PeL1) bzw. 8,5 - 9,0 (PeL2) zwei Fraktionen eluiert werden, die in Vorversuchen mit einem Puffer extrem hoher Salzkonzentration und gleichzeitig erhöhtem pH-Wert nicht gewonnen werden konnten (Abb. 29).

In Tabelle 14 ist die prozentuale Zucker- und Proteinzusammensetzung der Anionenaustauschfraktionen PeN1, PeN2, PeA1, PeA2, PeL1, PeL2 wiedergegeben.

Tab. 14: Prozentuale Zucker- und Proteinzusammensetzung der Anionenaustauscherfraktionen

	PeN1	PeN2	PeA1	PeA2	PeL1	PeL2
Proteingehalt	32,4 %	39,5 %	6,4 %	26,2 %	40,2 %	52,0 % [*]
Neutralsucker- gehalt						
Glucose	65,7 %	25,7 %	18,3 %	8,0 %	32,9 %	13,3 % [*]
Galaktose	-	-	-	-	Spuren	1,28 %
Mannose	-	-	-	Spuren	-	0,48 %
Xylose	-	-	-	-	2,4 %	0,44 %
Fucose	-	-	-	Spuren	3,9 %	3,70 % [*]
Ausbeute	2,2 %	14,0 %	9,3 %	17,8 %	25,6 %	12,0 %

^{*} Mittelwerte aus 3 Bestimmungen

Alle Fraktionen waren reich an Proteinen und enthielten als dominierenden Zucker Glucose. Die höchste Ausbeute brachten die mit alkalischer Lösung eluierten Fraktionen PeL1 und PeL2. Da der pH-Wert der eluierten Lösungen den Wert 9,0 nicht überschritt und die Chromatographie bei 4°C durchgeführt wurde, hatte keine Spaltung glykosidischer Zuckerbindungen oder N-glykosidischer Protein-Polysaccharid-Bindungen stattgefunden. Eine teilweise Denaturierung alkalilabiler Proteine oder Spaltung O-glykosidischer Serin/Threoninbindungen war jedoch nicht auszuschließen.

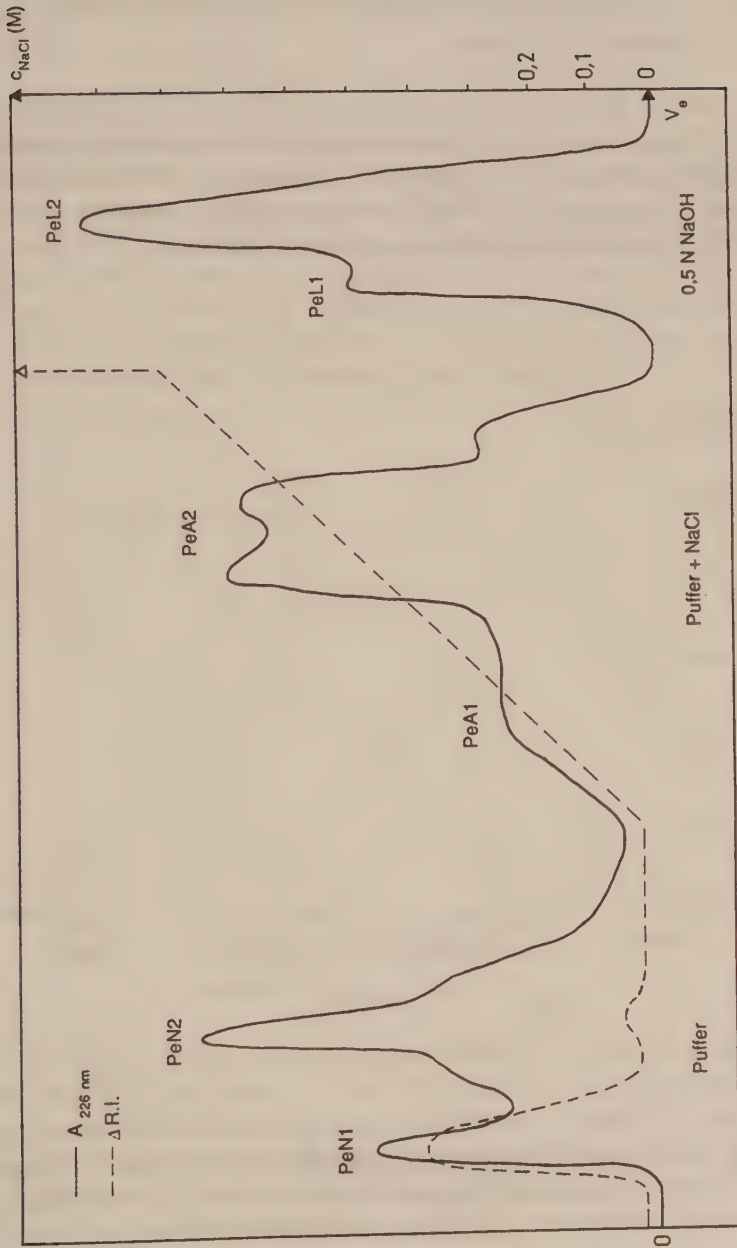


Abb. 29 : Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose®CL 6B

3.3.2. Komplementaktivität der neutralen und sauren Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie

Von den sechs erhaltenen Fraktionen zeigten nur die mit 0,5 N Natronlauge gewonnenen Fraktionen PeL1 und PeL2 im Testsystem CP 1 eine signifikante Komplementaktivität (Abb. 30). Die bei höherem pH-Wert eluierte Substanz PeL2 wurde, da stärker antikomplementär wirksam, weiter gereinigt.

Reduktion
der Lyse (%)

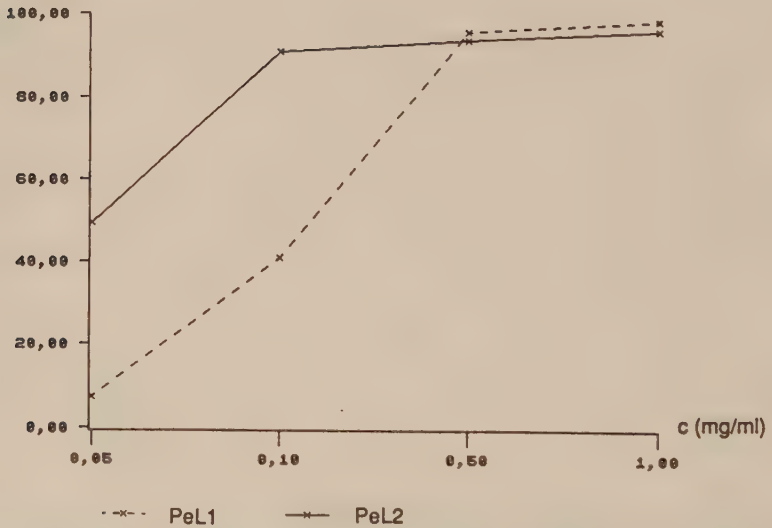


Abb. 30: Aktivität der Ionenaustauscherfraktionen PeL1, PeL2 im Klassischen Komplementweg (Testsystem CP 1)

3.4. Gelfiltration der aktiven, sauren Fraktion PeL2

Die Homogenität der Substanz PeL2 wurde durch Gelchromatographie an Trennmedien verschiedener chemischer Struktur bzw. Porengröße und mit Puffersystemen unterschiedlicher Molarität bzw. Wasserstoffionenkonzentration überprüft. Lediglich in einem stark basischen Puffersystem (0,05 M Glycin/Natronlauge pH 10,0) und mit dem Gelmaterial Sephacryl® S-400 (Fraktionierungsbereich ca. 10^4 - $5 \cdot 10^6$ für Proteine) konnten wir eine Auftrennung erreichen. Die Substanz des Hauptpeaks zeigte eine positive optische Drehung und war sowohl über ihre UV-Absorption als auch mit dem Refraktometer detektierbar. Ihr folgte ein zweiter links drehender Peak mit UV-Absorption und breiter Molekulargewichtsverteilung (Abb. 31).

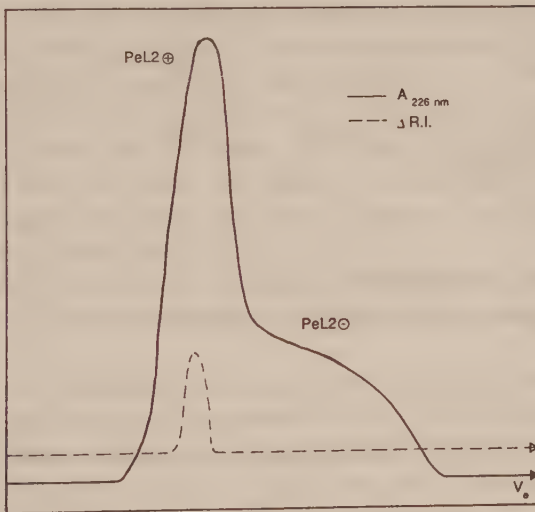


Abb. 31 : Chromatogramm der Gelfiltration von PeL2 an Sephacryl® S-400

Außer in ihrem Drehsinn unterschieden sich beide Peaks auch stark in ihrer Zusammensetzung. Die Angaben in Tabelle 15 beziehen sich auf die getrennten Substanzen aus fünf durchgeführten Gelchromatographien (insgesamt 10 mg PeL2). Trotz des Einsatzes eines stark alkalischen Puffers wurde bei der Gelfiltration eine nur unbefriedigende Trennleistung erzielt. Daher überprüften wir die Einheitlichkeit der Substanz PeL2 mit der **hydrophoben Interaktionschromatographie** (siehe C.3.5.), die nicht auf Molekulargewichtsunterschieden beruht.

Tab. 15 : Chemische Zusammensetzung der Gelchromatographie-Fractionen
PeL2 $\oplus$ und PeL2 $\ominus$

	PeL2 $\oplus$	PeL2 $\ominus$
Proteingehalt	21,9 %	43,6 %
Neutralzucker- gehalt		
Glucose	26,6 %	7,6 %
Fucose	4,1 %	0,7 %
Xylose	2,9 %	3,8 %
Mannose	-	1,6 %
Galaktose	-	1,1 %
Ausbeute aus 10 mg PeL2	4,1 mg	3,5 mg

Nur die Substanz des rechtsdrehenden Hauptpeaks, die sich auch durch höheren Neutralzuckergehalt auszeichnete, erwies sich im Komplementtest als aktiv.

3.5. Hydrophobe Interaktionschromatographie der aktiven, sauren Fraktion PeL2

Bei Proteinen und Glykoproteinen mit ähnlichen Ladungs- und Molekulargewichtsverhältnissen lassen sich effektive Trennergebnisse mit der **Hydrophoben Interaktionschromatographie** erzielen.

Sie beruht auf den hydrophoben Wechselwirkungen apolarer Verbindungen in polarer Umgebung. Die Hydrophobizität des beteiligten Proteins ist durch die exprimierten, hydrophoben Außenbezirke gegeben, die durch die Aminosäurezusammensetzung in ihrer Primärstruktur determiniert sind. Die an der Bindung beteiligte Matrix zeichnet sich durch hydrophobe Liganden wie Octyl- bzw. Phenylreste aus.

Als dritter Parameter spielt das wässrige Medium eine wichtige Rolle. Durch Zugabe mehrwertiger Ionen mit Aussalzcharakter (z.B. Ammoniumsulfat) wird die Hydrathülle den Proteinen teilweise entzogen und dadurch werden hydrophobe Bezirke des Proteins freigelegt. Unter diesen Bedingungen werden sehr hydrophile Komponenten im Ausschlufvolumen der Säule eluiert, während die gebundenen Verbindungen durch Erniedrigung der Ionenstärke, Erhöhung des pH-Wertes oder Veränderung der Polarität durch organische Lösungsmittel in einem zweiten Schritt abgelöst werden können.

Für die weitere Auftrennung der Substanz PeL2 verwendeten wir den weniger stark bindenden Phenylliganden. Als Gelbett erwies sich nach orientierenden Vorversuchen mit Phenyl-Sepharose® CL-4B eine Polyvinylmatrix (Phenyl-Fraktogel® HW 65 S, FAHN 1988) als vorteilhafter. Sie zeichnet sich neben einer hohen Trennleistung durch das Fehlen unspezifischer Wechselwirkungen mit Zuckern aus. Um die Löslichkeit der Substanz zu gewährleisten, verwendeten wir ein Puffersystem mit leicht alkalischem pH-Wert. Diese Lösung wurde danach portionsweise mit Ammoniumsulfat versetzt, bis eine 25 % Sättigung der Lösung erreicht war.

Im Ausschlufvolumen der Säule wurden zwei Substanzen eluiert, von denen nur die erste mit Refraktometer detektierbar war (PeH1, PeH2). Eine der gebundenen Substanzen wurde mit einem Puffer niedriger Ionenstärke eluiert (PeE1), während ein bis zwei weitere Komponenten nur durch pH-Erhöhung und Ethylenglykolzusatz desorbiert werden konnten (Abb. 32).

Mit Hilfe dieser Chromatographiemethode konnte die Substanz PeL2 in Einzelkomponenten aufgetrennt werden. Dabei traten jedoch bis zu 50 %ige Substanzverluste auf, die eine genauere strukturelle Untersuchung der Komponenten nicht zuließen. Die erhaltenen Mengen wurden aber für eine Überprüfung der Aktivität im Testsystem CP 1 und die Sulfatbestimmung des aktiven Peaks verwendet.

Bei einer Konzentration von 1 mg/ml lag die Hauptaktivität bei der Substanz des hydrophoben Peaks E1, der in einer Ausbeute von 10 % erhalten werden konnte. Da auch der nicht gebundene, erste Peak H1 Aktivität zeigte, könnte PeL2 entweder aus zwei verschiedenen aktiven Komponenten zusammengesetzt sein oder, falls die Substanz als Aggregat strukturell ähnlicher Komponenten vorliegt, durch die angewandte Trennmethode gespalten worden sein.

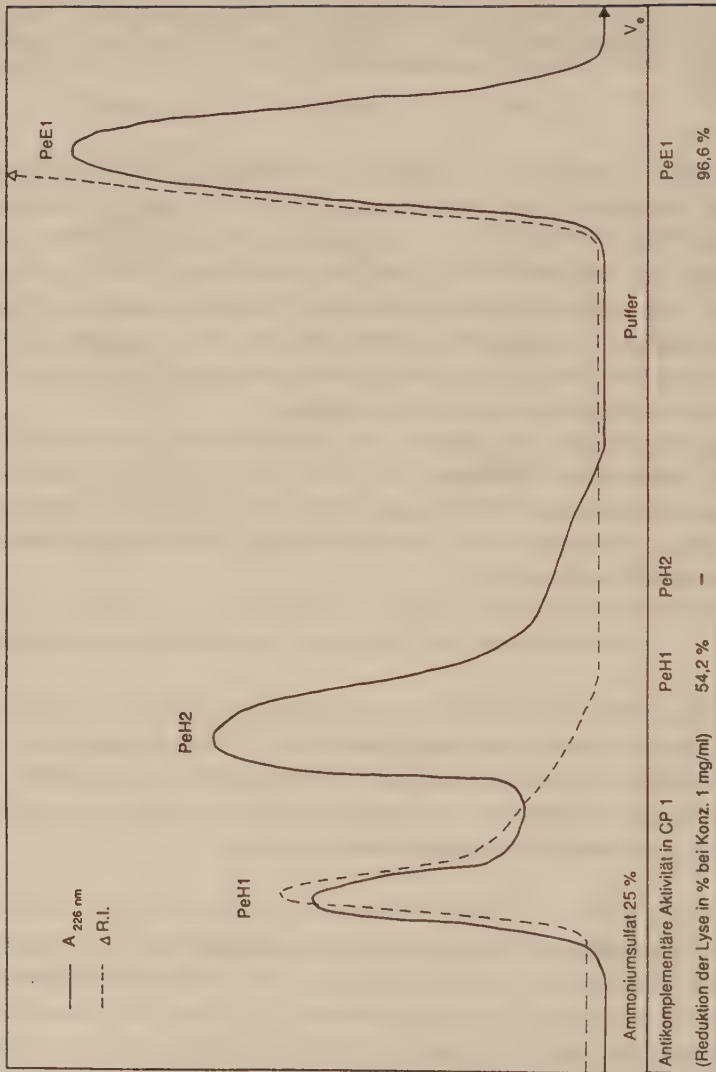


Abb. 32 : Chromatogramm der Hydrophoben Interaktionschromatographie

3.6. Strukturelle Charakterisierung des Glykoproteins PeL2

3.6.1. Elementaranalysen

Die C/H/N-Analyse lieferte 44,1 % Kohlenstoff, 6,5 % Wasserstoff und 8,0 % Stickstoff. Die Gesamtschwefelanalyse ergab einen Gehalt von 1,69 %.

Im IR-Spektrum der Substanz PeL2 (als KBr-Preßling) traten die charakteristischen Deformationsschwingungen veresterter Sulfatgruppen auf (S=O 1250 cm^{-1} , C-O-S $800\text{-}840\text{ cm}^{-1}$) (HUNT 1970).

Zur Schwefelbestimmung sulfatreicher Glykosaminoglykane werden nach deren Hydrolyse üblicherweise spektrophotometrische Methoden eingesetzt, die auf der Reaktion anorganischen Sulfats mit Bariumionen beruhen (TERHO *et al.* 1971, CHAPLIN *et al.* 1986). In eigenen Versuchen fanden wir bei mehreren Referenzverbindungen eine hohe Streuungsrate des Sulfatgehalts, so daß wir uns für den Einsatz der Ionenchromatographie mit Leitfähigkeitsdetektion entschieden.

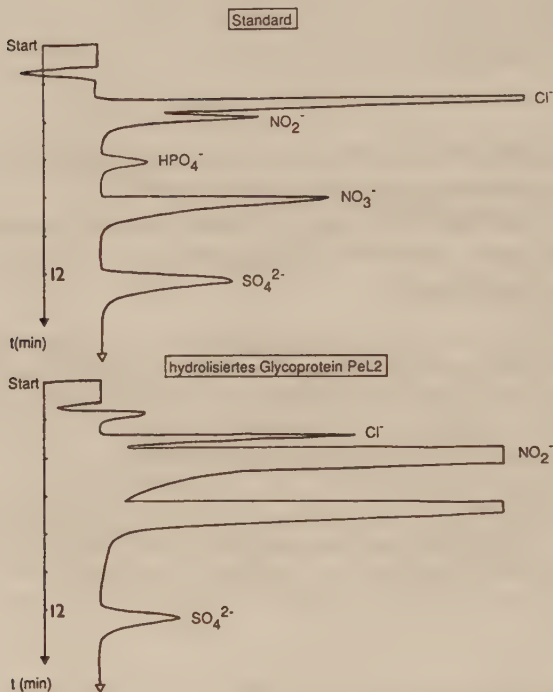
Für die Gehaltsbestimmung von Anionen wird die Probelösung von einem stark basischen Anionenaustauscher mit einem verdünnten Natriumcarbonat/Natriumhydrogencarbonat-Puffer eluiert. Dieser Säule ist eine Suppressorsäule nachgeschaltet, in der im Gegenstromprinzip mit verdünnter Säure ein Kationenaustausch ($\text{Na}^+ \rightarrow \text{H}^+$) stattfindet. Dabei wird die Leitfähigkeit des Eluenten stark verringert und gleichzeitig diejenige der zu Säuren umgesetzten Anionen vergrößert.

Die idealen Hydrolysebedingungen für sulfatierte Zucker wurden mit Hilfe von Referenzsubstanzen bekannten Sulfatgehalts ermittelt. Da größere Mengen an Chloridionen eine optimale Trennung und Quantifizierung der Anionen stören, wurde Trifluoressigsäure für die Hydrolyse gewählt. Der Methodenfehler betrug bei Carrageenan $\pm 1,3\%$.

Das Chromatogramm 1 zeigt den typischen Verlauf einer Standardelution, während im Chromatogramm 2 die Anionenzusammensetzung der Substanz PeL2 analysiert ist (Abb. 33).

Die quantitative Auswertung ergab für das Glykoprotein PeL2 einen Sulfatgehalt von 11,03 %. Im Vergleich dazu erwies sich die aktive Substanz PeE1 der hydrophoben Interaktionschromatographie (C.3.5.) mit 27,32 % als eine um das 2,5fache höher sulfatierte Komponente.

Abb. 33 : Ionenchromatographie zur Bestimmung anorganischen Sulfats



3.6.2. Molekulargewichtsbestimmung

Gelfiltration an Sephacryl®:

Die Molekulargewichtsbestimmung wurde auf einer Sephacryl® S-400 Säule mit dem Puffersystem Glycin/Natronlauge pH 10,0 durchgeführt. Als Eichsubstanzen dienten Proteine unterschiedlichen Molekulargewichtes. Aus der Formel $V_e = f \cdot (\log M)$ (GRANATH *et al.* 1967), in der V_e das Elutionsvolumen und M das Molekulargewicht bedeuten, und den aufgestellten Eichgeraden ließ sich für die Substanz PeL2 ein mittleres Molekulargewicht von 280000 D ableiten.

Gelpermeationschromatographie (HP-GPC) :

Diese Bestimmung wurde an einem Säulensystem bestehend aus μ -Bondagel®E-125 und μ -Bondagel®E-500 durchgeführt. Die Säulen, die nach steigendem Ausschlußvolumen hintereinander geschaltet wurden, besitzen laut Hersteller einen Trennbereich von 2000-500000 D. Auch in diesem Falle wurde mit Proteinen geeicht. Als Elutionspuffer wurde ein 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 6,5 verwendet.

Wir erhielten einen einheitlichen Substanzpeak mit hoher UV-Absorption, für den ein mittleres Molekulargewicht von 32000 D ermittelt wurde.

Das Glykoprotein verhielt sich in beiden Untersuchungen homogen, obwohl mit hydrophober Interaktionschromatographie eine Trennung in vier Komponenten möglich war. Das stark variierende Molekulargewicht war wahrscheinlich durch Interaktionen mit dem Säulenmaterial (im Falle der Gelpermeationschromatographie) und eine daraus resultierende Retardierung der Substanz bedingt, da ein starker Druckanstieg mit reduzierter Durchflußrate beobachtet wurde. Für die Molekulargewichtsbestimmung von Glykoproteinen ist zudem der Einsatz strukturähnlicher Eichsubstanzen einer Proteineichung oder Dextraneichung vorzuziehen.

3.6.3. Charakterisierung des Proteinanteils der Substanz PeL2

Der Proteingehalt (nach LOWRY 1951) der Substanz PeL2 wurde mit 51,6 % bestimmt.

Die exakte Aminosäurezusammensetzung ist in Tabelle 16 wiedergegeben.*

Auffallend ist die hohe Konzentration der sauren Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure. Außerdem wurden geringe Spuren von N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglucosamin detektiert.

* Die Aminosäureanalyse wurde von Prof. Dr. G. Braunitzer, Frau Dr. Rodewald, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt.

Die Aminosäureendgruppenbestimmung lieferte Glycin und Alanin im Verhältnis 2 : 1.* Da somit kein einheitlicher Proteinanteil vorlag, wurde keine weitere Sequenzierung unternommen.

Tab. 16 : Aminosäurezusammensetzung des Glykoproteins PeL2

Aminosäure	% des Proteinanteils
Asparaginsäure	5,7
Threonin	3,0
Serin	3,0
Glutaminsäure	5,8
Arginin	2,1
Prolin	2,6
Glycin	3,7
Alanin	3,5
Cystein	0,7
Valin	3,6
Methionin	1,2
Isoleucin	2,6
Leucin	4,1
Tyrosin	1,6
Phenylalanin	1,9
Histidin	2,0
Lysin	2,5
Tryptophan	-

Mit einem Biotronic LC 5000 AS Analysator ermittelt

3.6.4. Charakterisierung des Kohlehydratanteils der Substanz PeL2

Eine Quantifizierung des Kohlehydratanteils von Substanz PeL2 mit Hilfe des Anthrontestes und über die gaschromatographische Bestimmung der Alditolacetate führte zu fast deckungsgleichen Werten (SPIRO 1966, BLAKENEY *et al.* 1983).

Zuckergehalt PeL2 :	18,6 % (Anthrontest)
	19,2 % (Alditolacetate)

* Die Sequenzierung wurde von Frau Dr. A. Henschen, Prof. Dr. K. Kuehn, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt.

Die molare Zusammensetzung des Kohlehydratanteils ist aus Tabelle 17 ersichtlich.

Tab. 17 : Molare Zuckerzusammensetzung des neutralen Kohlehydratanteils im Glykoprotein PeL2

Glucose	1,0
Fucose	0,3
Galaktose	0,1
Xylose	0,03
Mannose	0,04

Mit dem Carbazoltest (BITTER *et al.* 1962) wurden 6,2 % Uronsäuren gemessen. Da nach einer Hydrolyse mit Trifluoressigsäure dünnschichtchromatographisch keine Uronsäuren detektiert werden konnten und nach KAKAC (1974) Glucose bei dieser Bestimmung falsch positive Werte ergeben kann, wurde im Carbazoltest eine Standardkurve mit Glucose aufgestellt. Diese Untersuchung zeigte, daß 2,7 % des Uronsäuregehalts des Glykoproteins durch den Glucosegehalt erklärbar sind.

3.6.5. Methylierungsanalyse

Zur Klärung der Bindungsverhältnisse im Kohlehydratteil wurde nach HAKOMORI (1964) methyliert und die partiell methylierten Alditolacetate über GC-MS Analyse identifiziert (BJÖRNDAL *et al.* 1970) (Abb. 34).

Durch Vergleich der relativen Retentionszeiten und der Massenspektren mit Literaturwerten (JANSSON *et al.* 1976) waren die in Tabelle 18 wiedergegebenen Zuordnungen möglich.

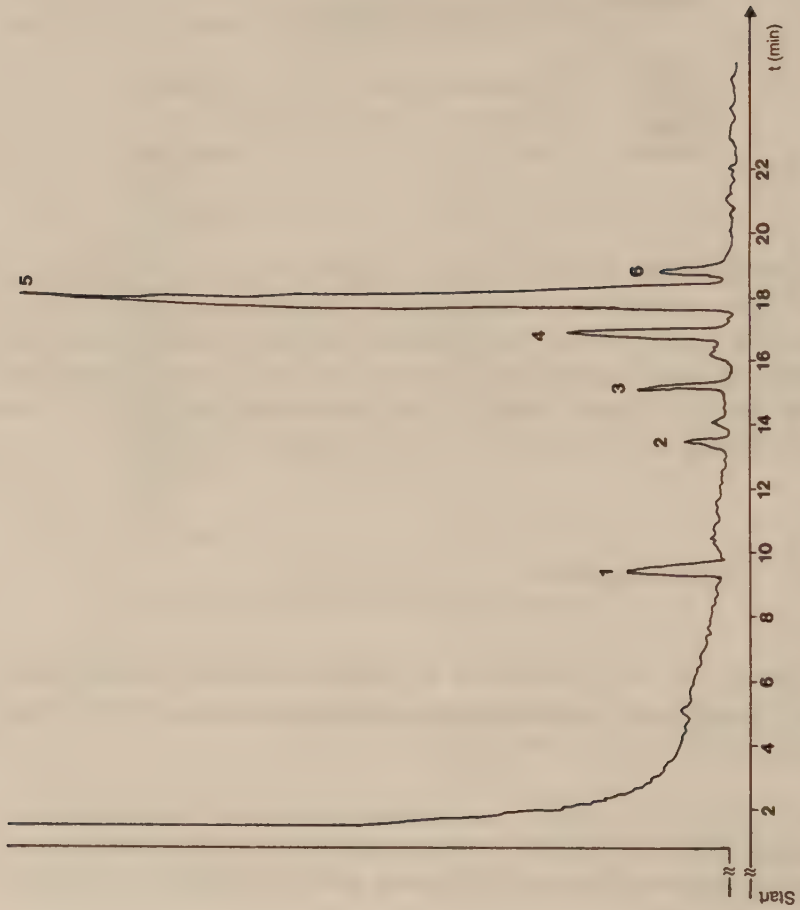


Abb. 34: GC partiell methylierter Alditolacetate von PeL2

Tab. 18: Methylierungsanalyse des Glykoproteins PeL2

Peak	molare Zusammen- setzung*	Alditolacetate	Charakteristische Bruchstücke (m/e)
1	0,14	1,4-Di-O-acetyl-2,3,5- -tri-O-methylpentitol	71, 87, 101, 117, 129, 145, 161
2	0,28	1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6- -tetra-O-methylhexitol	75, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205
3	0,19	1,3,4,5-Tetra-O-acetyl- -6-desoxy-2-O-methyl- hexitol	85, 87, 99, 113, 117, 129, 141, 159, 173, 201, 275
4	0,25	6-Desoxyhexitol penta- acetat	99, 103, 115, 128, 145, 157, 170, 187, 201, 217, 231
5	1,00	1,4,5-Tri-O-acetyl- 2,3,6-tri-O-methyl- hexitol	87, 99, 101, 113, 117, 129, 143, 161, 173, 233
6	0,16	Pentitol pentaacetat	73, 85, 103, 115, 127, 145, 158, 175, 187, 200, 217, 289

* Die Werte für die molare Zusammensetzung wurden nach SWEET (1975) korrigiert.

Der dominierende Peak 5 konnte durch Vergleich der relativen Retentionszeiten als (1→4)-verknüpfte pyranosidische Hexose identifiziert werden. Aus der molaren Zuckerzusammensetzung der Alditolacetate ging hervor, daß es sich bei dieser Hexose um Glucose handeln mußte. Daher kann angenommen werden, daß die Hauptkette aus (1→4)-verknüpfter D-Glucose besteht.

Neben terminaler furanosidischer Pentose (Peak 1) wurde auch terminale pyranosidische Hexose (Peak 2) gefunden. Es kann sich bei der Pentose aufgrund der identifizierten Zucker nur um Xylose handeln, während die Hexose eine Glucose oder Galaktose darstellen muß.

Peak 4 und 6 resultieren aus einer Untermethylierung, obwohl die Substanz vor der Analyse acetyliert worden war.

Als einzige Verknüpfungsstelle erwies sich eine 1,3,4-verknüpfte Desoxyhexopyranose oder eine 1,3,5-verknüpfte Desoxyhexofuranose. Damit stellte die L-Fucose den Verzweigungspunkt des Polysaccharids dar. Aus der molaren Zusammensetzung geht hervor, daß auf vier Glucosebausteine eine L-Fucose folgt, die an Position 3 mit Seitenketten verknüpft war. In der Literatur wird Fucose meist als terminaler Zuckerrest oder als Bestandteil einer langen Kette wie z.B. in Fucoidan beschrieben.

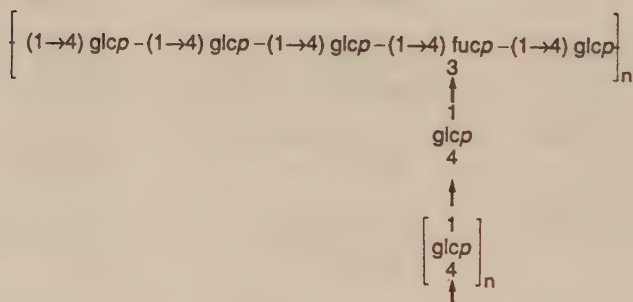


Abb. 35 : Strukturvorschlag für das Glykoprotein PeL2

3.7. Pharmakologische Untersuchungen des Glykoproteins PeL2

3.7.1. Antikomplementäre Wirkungen auf das Gesamtkomplement und Einzelkomponenten

Bei der Testung des Glykoproteins PeL2 im Klassischen Weg wurde eine starke antikomplementäre Wirkung der Substanz erhalten. Bis zu einer Konzentration von 0,1 mg/ml war eine nahezu 100 %ige Verringerung der hämolytischen Reaktion zu beobachten (Tab. 19). Ähnliche Resultate konnten im Alternativen Weg nach Vorinkubation der Substanz mit konzentriertem menschlichen Serum erzielt werden (AP 2). Die antikomplementäre Aktivität im Alternativen Weg verringerte sich stark, wenn die Substanz ohne Vorinkubation im Testsystem AP 1 getestet wurde.

Tab. 19: Komplementaktivität des Glykoproteins PeL2 in den Screening-Testsystemen CP 1, AP 1, CP 2, AP 2, ausgedrückt als prozentuale Reduktion der hämolytischen Kontrollreaktion

Konzentration	CP 1	AP 1	CP 2	AP 2
1,0 mg/ml	95,5 ± 2,6	20,7 ± 0,1	95,8 ± 1,1	95,2 ± 3,5
0,1 mg/ml	90,7 ± 2,5	-	79,6 ± 2,6	90,9 ± 6,2
0,05 mg/ml	49,4 ± 1,7	n.t.	n.t.	n.t.
0,01 mg/ml	-	n.t.	25,9 ± 5,3	34,3 ± 10,5

* Mittelwerte aus 3-5 Messungen ± S.D.

- = Hemmung < 5 %

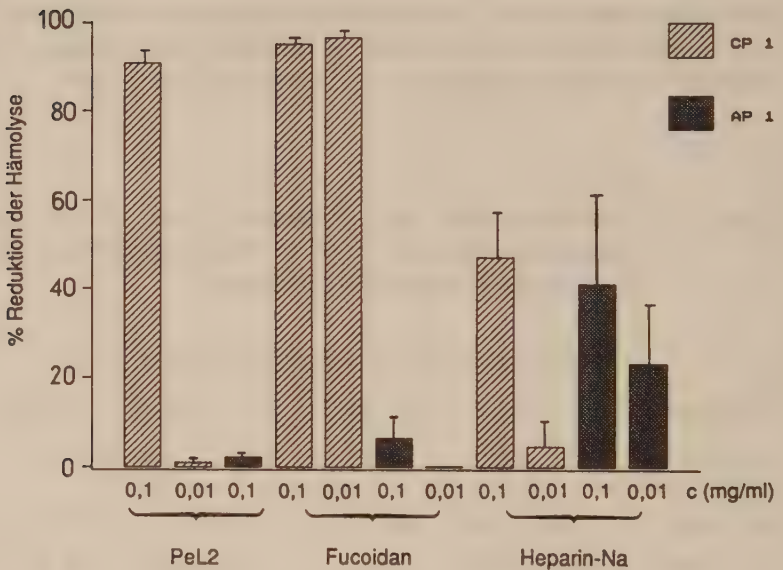
CP 1, AP 1 : ohne Vorinkubation, CP 1 mit GP-Serum

CP 2, AP 2 : mit Vorinkubation

n.t. = nicht getestet

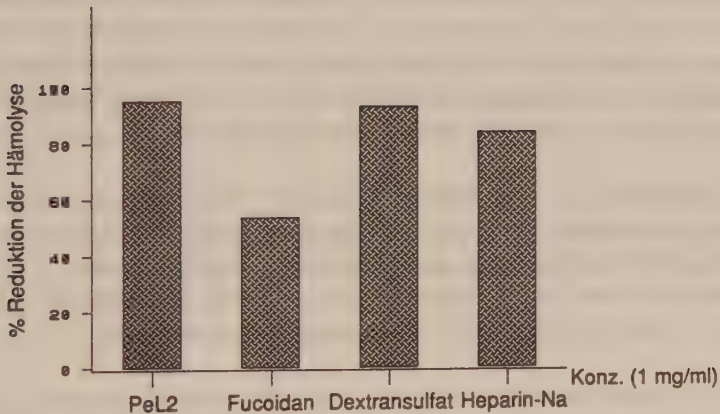
Bei einem Vergleich der Aktivität mit dem aus sulfatierter Fucose aufgebauten Fucoidan und dem Glykosaminoglykuronoglykan Heparin zeigt das Muschelglykoprotein ein ähnliches Wirkprofil wie Fucoidan. Beide üben den Großteil ihrer Wirkung im klassischen Weg aus. In beiden Wegen wird bei der Substanz PeL2 ein rascherer Wirkungsabfall gefunden (Abb. 36).

Abb. 36 : Vergleich der antikomplementären Wirkungen von PeL2, Fucoidan und Heparin in den Testsystemen CP 1 und AP 1



Die ähnlich hohen Aktivitäten sulfatierter Glykoproteine und Polysaccharide im Alternativen Weg (AP 2 mit Vorinkubation) sprechen für einen analogen Wirkmechanismus der beiden Verbindungsklassen (Abb. 37). Nach der Literatur dürfte sowohl die antikoagulierende als auch **Anti-HIV** Wirkung dieser Substanzen (siehe B.3.3.1.) stark von den Sulfatgruppen abhängen (OFOSU *et al.* 1987, YOSHIDA *et al.* 1988).

Abb. 37 : Komplementaktivität sulfatierter Polysaccharide im Vergleich zu PeL2 im Alternativen Weg (AP 2)



In den **Immunfixations-Tests** führte die Substanz PeL2 in einer Konzentration von 180 μg / 40 μl NHS zu einer Stimulierung der Faktor B Konversion um $52,2 \pm 3,9$ % (entspricht 66,6 % rel.). Der Abbau der Komponente C3 wurde weniger stark beeinflusst ($35,4 \pm 6,5$ %). Auch bei dieser Testung korrelierten die Aktivitäten von PeL2 und Fucoidan stark.

Da durch zwanzigminütiges Kochen in Veronalpuffer oder Autoklavieren die Aktivität von PeL2 nicht verringert wurde, kann die antikomplementäre Wirkung des Glykoproteins PeL2 dem **sulfatierten Zuckeranteil** zugeordnet werden.

Bei der Darstellung der Substanz mußte teilweise mit stark alkalischen Lösungen gearbeitet werden. Der Einfluß dieser Behandlung auf die antikomplementäre Wirksamkeit wurde ebenfalls überprüft. Das Glykoprotein wurde 24 Stunden in Glycin/Natronlauge-Puffer pH 9,5 bei 4°C gerührt und nach Dialyse und Gefrier-trocknung wiederum getestet. Auch hierdurch hatte die Substanz im Testsystem CP 1 nicht an Aktivität verloren.

3.7.2. Hämagglutinationsteste mit PeL2

Da in der Hämolymphe vieler Gastropoden und Mollusken lektinähnliche Agglutinine nachgewiesen wurden (BRETTING *et al.* 1973) und diese auch in der Familie der Mytilidae, der die Muschel *Perna canaliculus* angehört, vorkommen (RENWRANTZ *et al.* 1982), untersuchten wir die Agglutinationsfähigkeit der Substanz PeL2 auf sensibilisierte Hammelerythrozyten bzw. Kaninchenerythozyten unter Verwendung des Testansatzes. Wie bereits ausgeführt (B.2.5.2.), zeigte sich eine "Teppichbildung", die aber keine typische Hämagglutination darstellte.

Um Lektineigenschaften des isolierten Glykoproteins PeL2 auszuschließen, wurden Hämagglutinationsteste mit Erythrozyten verschiedener Spezies durchgeführt*. Es handelte sich um Erythrozyten von Huhn, Rind, Mensch (Blutgruppe A, O, B), Schwein und Maus, die mit Pronase oder Neuraminidase behandelt bzw. nativ eingesetzt wurden. Mit PeL2 wurde keinerlei Hämagglutination beobachtet.

Auch in Agarpräzipitationstesten mit Serumglykoproteinen, Galaktanen und Bakterienantigenen konnten keine Wechselwirkungen mit dem Muschelglykoprotein nachgewiesen werden (Versuchangaben : UHLENBRUCK *et al.* 1978). Vermutlich sind die im Komplementscreening beobachteten Effekte auf Erythrozyten durch die stark negative Ladung der Substanz bedingt (UHLENBRUCK 1987).

3.7.3. Stimulierung der Lymphozytenproliferation durch PeL2

Von den wichtigsten, sulfatierten Polysacchariden wie Carrageenan, Dextransulfat und Heparin ist ihre mitogene Aktivität auf Lymphozyten bekannt (PALACIOS *et al.* 1982, SUGAWARA *et al.* 1982, ISHIZAKA *et al.* 1980). BRAUN (1983) isolierte aus Rotalgen ein sulfatiertes Polysaccharid, das *in vitro* stimulierende Eigenschaften auf menschliche Lymphozyten besaß.

* Die Untersuchungen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. G. Uhlenbruck, Institut für Immunbiologie, Medizinische Universitätsklinik Köln, durchgeführt.

Wir verwendeten das modifizierte Testsystem nach DUTTON (1964) mit einer Zellzahl von 10^5 Lymphozyten und einer Inkubationsdauer von 88 Stunden. Der Einfluß der getesteten Substanzen auf die Lymphozytenproliferation wurde über den Einbau Tritium-markierten Thymidins gemessen. Die Lymphozytenaktivität wurde ohne und mit vorausgegangener Vorstimulation mit Phytohämagglutinin oder Concanavalin A ermittelt.

In den folgenden beiden Abbildungen ist der Einfluß des sulfatierten Glykoproteins PeL2 auf die DNA-Syntheserate menschlicher Lymphozyten im Vergleich zu sulfatierten Polysacchariden dargestellt.

Abb. 3B: Vergleich der Aktivität von PeL2 mit verschiedenen sulfatierten Polysacchariden auf die Lymphozytenproliferation

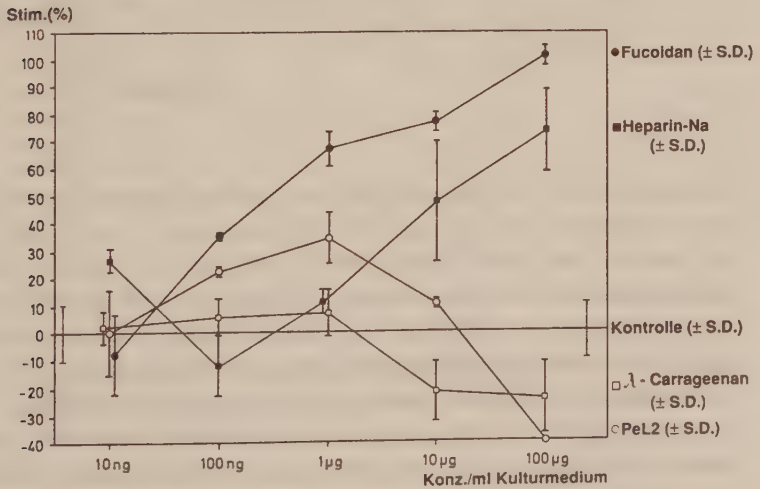
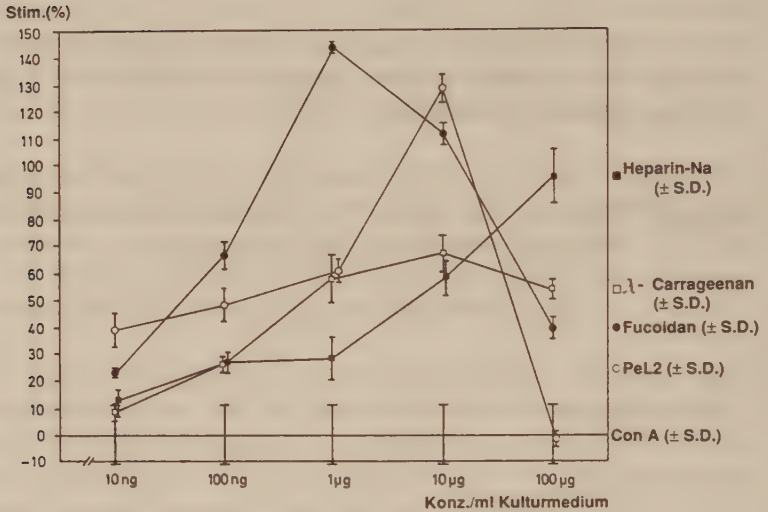


Abb. 39 : Vergleich der Aktivität von PeL2 mit verschiedenen sulfatierten Polysacchariden auf die Lymphozytenproliferation nach Vorstimulierung mit Con-A



Die Substanz PeL2 zeichnet sich durch eine **Immunstimulation** mit dosisabhängigem Kurvenverlauf aus, die bei einer Konzentration von 1 µg/ml den Maximalwert erreichte. Bei hohen Konzentrationen (100 µg/ml) wurde eine suppressive Wirkung beobachtet. Fucoidan und Heparin wirkten von allen getesteten Substanzen am stärksten immunstimulierend, während Carrageenan nach anfänglicher Suppression in niedrigeren Konzentrationen keine Aktivität mehr besaß.

In Gegenwart von Mitogenen wurde für alle Substanzen eine erhöhte Lymphozytenaktivität gemessen. Der schon ohne Vorstimulation beobachtete charakteristische Kurvenverlauf von Substanz PeL2 trat jetzt stärker hervor. Wie auch bei Fucoidan erfolgte ein starker Anstieg der Lymphozytenproliferation im Konzentrationsbereich von 0,1 µg-10 µg/ml. Bei Vorstimulierung mit Con-A zeigte auch Carrageenan eine stimulierende Aktivität. Der Einfluß von Heparin auf menschliche Lymphozyten nahm dosisabhängig von Maximalwerten bei 100 µg/ml langsam ab.

Interessanterweise hatte PeL2 in vitro keinen stimulierenden Einfluß auf das phagozytäre System. Weder im Granulozytentest nach BRANDT (1967) noch im Biolumineszenztest (ALLEN 1981) konnte eine signifikante Phagozytosesteigerung ermittelt werden.

3.7.4. Stimulierung des Tumor-Nekrose-Faktors durch PeL2

Der Tumor-Nekrose-Faktor, ein Polypeptid, das nach Stimulierung von aktivierten Makrophagen sezerniert werden kann, spielt als Mediator- und Effektorsubstanz eine wichtige Rolle in der Nekrose von Tumoren. Eine Stimulierung der Freisetzung dieses Faktors wurde bei einigen Polysacchariden beobachtet.

Wie aus Tabelle 20 hervorgeht, vermag das Glykoprotein PeL2 dosisabhängig die Freisetzung des Tumor-Nekrose-Faktors zu stimulieren.

Tab. 20 : Dosisabhängige Freisetzung des Tumor-Nekrose-Faktors durch Stimulation von Makrophagen durch PeL2 *

$\mu\text{g PeL2} /$ $1 \cdot 10^5$ Makrophagen	TNF- α (units)
25,0	4000 U
12,5	500 U
6,0	120 U
3,0	-

Im Vergleich dazu induziert LPS von *Salmonella abortus equi* bei einer Konzentration von $10^{-0,5} \mu\text{g}$ in 10^5 Makrophagen die Freisetzung von 2000 U TNF- α .

Mit diesen Resultaten konnte die Substanz PeL2 als gut positiver (+++) Stimulator der TNF- α Ausschüttung klassifiziert werden.

* Die Untersuchungen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. M.-L. Lohmann-Matthes, Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Hannover, durchgeführt.

3.7.5. Hemmung der Leukozyten-Elastase durch PeL2

Neutrale Proteinasen wie die Leukozyten-Elastase, Cathepsin G und Kollagenasen, die von neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden, sind bei Krankheiten mit gesteigerter Phagozytoserate, wie chronischer Polyarthrit, im Knorpel in großen Mengen nachgewiesen worden (VELVART *et al.* 1981). Die hohe knorpelzerstörende Aktivität der Leukozyten-Elastase führte zu der Suche nach spezifischen Enzym-inhibitoren. Auch von sulfatierten Polysacchariden wird über eine Hemmung dieses Enzyms berichtet (BAICI *et al.* 1980).

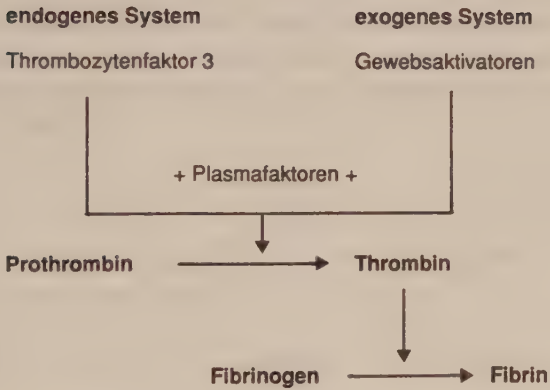
Wir untersuchten das Glykoprotein PeL2 in einem fluorimetrischen Testsystem auf eine Enzyminhibition der humanen Leukozyten-Elastase. Es wurde ein Peptidderivat als Substrat verwendet, das nach hydrolytischer Spaltung intensiv fluoreszierendes Aminomethylcumarin freisetzt.

Wir erhielten eine 50 %ige Hemmung des Enzyms (Konz. im Test : 50 ng/ml) bei 45 µg eingesetzter Substanz. Damit ist ein ca. 1000facher Überschuß an Inhibitor nötig, um eine signifikante Wirkung zu erhalten. Das Glykoprotein ist demnach nur ein schwacher Inhibitor der humanen Leukozyten-Elastase.

3.7.6. Beeinflussung der Blutgerinnungskaskade durch PeL2

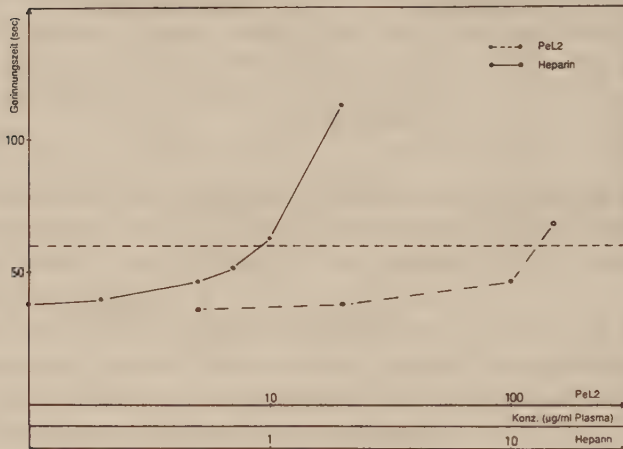
Die Blutgerinnung kann durch zwei, teilweise unabhängige proteolytische Kaskaden, das endogene und das exogene System, aktiviert werden (LORAND 1976) (Abb. 40).

Das für seine gerinnungshemmenden Eigenschaften bekannte, sulfathaltige Polysaccharid Heparin und das Glykoprotein PeL2 wurden in der partiellen Thromboplastinzeit (PTT), einem Gruppentest für das endogene System, und in der Thromboplastinzeit (PT, früher Prothrombinzeit), einem Gruppentest für das exogene System, untersucht. Angewendete Faktorenteste waren die direkte Hemmung des Faktors Xa durch Antithrombin III (die Hemmung kann durch Substanzen verstärkt werden) und der Heptest[®]. Letzterer zeigt den indirekten Einfluß von Substanzen auf den Faktor Xa und auf Thrombin, und damit eine Thrombinhemmung, an.

Abb. 40 : Vereinfachtes Blutgerinnungsschema

In Abbildung 41 sind die Einflüsse von PeL2 und Heparin als Referenzsubstanz auf die PTT dargestellt. Die Wirkung des Muschelglykoproteins im Vergleich zu Heparin war äußerst gering. Eine PTT von 60 Sekunden wurde durch 130 µg/ml PeL2 und von 0,9 µg/ml Heparin erreicht. In allen drei anderen Testsystemen war PeL2 in den verwendeten Konzentrationen wirkungslos.

Abb. 41 : Vergleich der gerinnungshemmenden Aktivität des Glykoproteins PeL2 mit Heparin



3.7.7. Überprüfung der Inhibierung pathophysiologisch wichtiger Enzyme mit PeL2

Das Glykoprotein besaß in einer Konzentration von 40 µg/ml Testansatz keinen hemmenden Einfluß auf die Cyclooxygenase und Lipoxygenase (WIERER 1988, FESSLER 1988). Negativ verliefen auch Untersuchungen mit Leucinaminopeptidase, Aminopeptidase M, Aminopeptidase A, alkalischer Phosphatase, Dipeptidylpeptidase IV und Urokinase.*

* Die Testungen erfolgten bei Prof. Dr. G. Vogel, Höchst AG, Frankfurt.

3.8. Überprüfung verschiedener Perna canaliculus - Präparationen auf ihren komplementaktiven Glykoproteingehalt

Bei Versuchen, das Glykoprotein PeL2 aus neu zur Verfügung gestellten Extrakten* zu isolieren, stellten wir fest, daß schon bei den ersten Fraktionierungen keine Komplementaktivität erhalten werden konnte. Eine orientierende Zuckerbestimmung ergab, daß die Kohlenhydratgehalte großen Schwankungen unterworfen waren (siehe Tab. 21).

Tab. 21 : Prozentuale Zuckerzusammensetzung der Chargen
Perna I und Perna II

Zucker	Perna I	Perna II
Glucose	15,88 %	20,20 %
Fucose	0,25 %	0,17 %
Arabinose	0,41 %	0,43 %
Mannose	-	0,50 %

Bei der Dialyse der in Wasser gelösten Ammoniumsulfatpräzipitate beobachteten wir bei einigen Chargen eine hohe Cellulaseaktivität. Die daraufhin innerhalb 12 Stunden mit zweistündigem Wasserwechsel dialysierten Fällungen wiesen nach der Gefriertrocknung nur noch 2,3 % Glucose und minimale Komplementaktivität auf, die teilweise von starker zytotoxischer Wirkung begleitet war. Bei der Anionenaustauschchromatographie wurde bei allen Chargen mit alkalischer Lösung eine Fraktion eluiert, die jedoch nur Spuren von Zucker und keine antikomplementäre Aktivität enthielt.

* Seatone®, Seatone forte® (Perna 2-6), Pernaextrakt (Perna I,II), Herstellungsdatum 1984-1987, Fa. McFarlane, Auckland, Neuseeland

Weiter Versuche zur Isolierung von sulfatierten Polymeren wurden mit einer modifizierten Methode nach SCOTT (1960) durchgeführt.

Diese beruht auf der Komplexbildung zwischen Polyanionen und quaternären Ammoniumverbindungen wie Cetylpyridiniumchlorid. Mit dieser Methode können auch uronsäurehaltige Polysaccharide, saure Glykoproteine und einige Proteine (abhängig vom pH-Wert und isoelektrischen Punkt), jedoch keine Neutralzucker isoliert werden. Durch konzentrierte Salzlösungen (2 - 5 M NaCl) oder Zusatz von organischen Lösungsmitteln wurden die Präzipitate in Lösung gebracht, zur Reinigung 2 -3 mal mit Ethanol gefällt, dialysiert und gefriergetrocknet.

Auffallend war die außerordentlich schlechte Löslichkeit der Cetylpyridiniumkomplexe aus verschiedenen Pernaextrakten. Die gewonnenen Substanzgemische aus dem Extrakt Perna I und Perna II wiesen nur ca. 3 % Protein, stark variierende Glucosewerte und ca. 1,2-1,5 % anorganisches Sulfat auf.

Im Testsystem CP 1 zeigte keine der Fällungen eine Komplementaktivität. Heparin, das demselben Isolierungsgang unterworfen wurde, verlor durch diese Methode nicht an Aktivität.

In einem weiteren Versuch wurde das früher isolierte Glykoprotein PeL2 einer Cetylpyridiniumfällung unterworfen. Das Präzipitat war aber weder mit 5 M Natriumchloridlösung noch mit verdünntem Ethanol in Lösung zu bringen. Diese Isolierungsmethode war demnach für die Gewinnung von PeL2 nicht geeignet.

Unabhängig davon müßten aber andere Gründe dafür verantwortlich sein, daß das Glykoprotein PeL2 aus den neuen Extraktchargen nicht mehr reproduzierbar wiedergewonnen werden konnte.

Dabei kam folgendes in Frage :

1. Das Vorliegen von Extrakten mit geringem oder fehlendem sulfatierten Kohlehydratanteil.
2. Verlust der Hauptmenge des sulfatierten Polysaccharidanteils durch enzymatische Hydrolyse.

4. **Enzymatische Untersuchungen zweier verschiedener Chargen *Perna canaliculus* und Vergleich der Enzymaktivitäten mit Miesmuschel und *Auster*.**

4.1. **Glykohydrolytische Aktivität von Muschelextrakten**

In mehreren Gastropoden, die ebenso wie die Muscheln der Klasse der Mollusken angehören, wurden Glykohydrolasen, wie Glucosaminidase, Glucosidase und Mannosidase nachgewiesen (HUNT 1970). Da keine Literatur über Enzymaktivitäten von Mytilidae existierte, untersuchten wir zwei Chargen lyophilisierten Muschel-extraktes (Perna I, Perna II) auf zuckerabspaltende Aktivität. Außer dem qualitativen Nachweis interessierte auch der quantitative Vergleich dieser Aktivitäten innerhalb verschiedener, auf die gleiche Art aufbereiteter Muschelextrakte. Wir wählten dafür die Miesmuschel und die Auster aus.

4.1.1. **Testmethodik**

Wir verwendeten für unsere Messungen als Maßeinheit das Katal, d.h. die katalytische Aktivität, die in einem definierten Testsystem ein 1 Mol Substrat pro Sekunde umwandelt. Die spezifische Aktivität wurde mit Hilfe des Proteingehaltes der Enzymlösungen berechnet (kat/mg Protein).

Als Substrate dienten p-Nitrophenyl-Derivate, die mit unterschiedlichen Pyranosen verknüpft waren. Die enzymatische Hydrolyse dieser Substanzen erfolgt sowohl zucker- als auch verknüpfungsspezifisch. Das Reaktionsprodukt p-Nitrophenol kann spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert werden.

Durch die Verwendung einer "Abstoppmethode" (MATTENHEIMER 1986) wurde eine erhöhte Sensitivität der Auswertung erreicht und der Einsatz eines stark sauren pH -Wertes während der Inkubation möglich, wenn dieser eine optimale Enzymaktivität versprach. Als essentiell muß angesehen werden, daß die Linearität der Reaktion über den gesamten Inkubationszeitraum nachgewiesen ist.

Nur eine der enzymatischen Bestimmungen (N-Acetyl- β -D-glucosaminidase-Aktivität) wurde wegen ihrer hohen Reaktionsgeschwindigkeit mit einer kontinuierlichen direkten Auswertung des gebildeten p-Nitrophenols bei pH 6,5 durchgeführt.

In Vorversuchen wurden die wichtigen Parameter der enzymatischen Reaktion optimiert. Dazu zählt die Substratkonzentration, die so hoch gewählt wurde, daß sie keinen Einfluß mehr auf die Umsatzrate ausübte. Weiterhin wird die Aktivität eines Enzyms auch durch die Wasserstoffionenkonzentration, die Ionenstärke des Mediums und die Temperatur beeinflußt (SCOPES 1983). Daher bestimmten wir die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Hydrolysen mit verschiedenen Substratkonzentrationen und Puffersystemen. Außer bei der Bestimmung der Cellulaseaktivität wählten wir die von der Enzymkommission der Internationalen Union für Biochemie in ihrem zweiten Bericht 1964 vorgeschlagene Temperatur von 30°C. Die Inkubationsbedingungen wurden so eingerichtet, daß die Zeit-Umsatzkurve während der Meßzeit linear verlief (Reaktion nullter Ordnung).

Die Abbildung 42 zeigt stellvertretend für alle anderen Aktivitätsbestimmungen die Hydrolyse von p-Nitrophenyl- α -L-fucopyranosid durch vier verschiedene Muschel-extrakte.

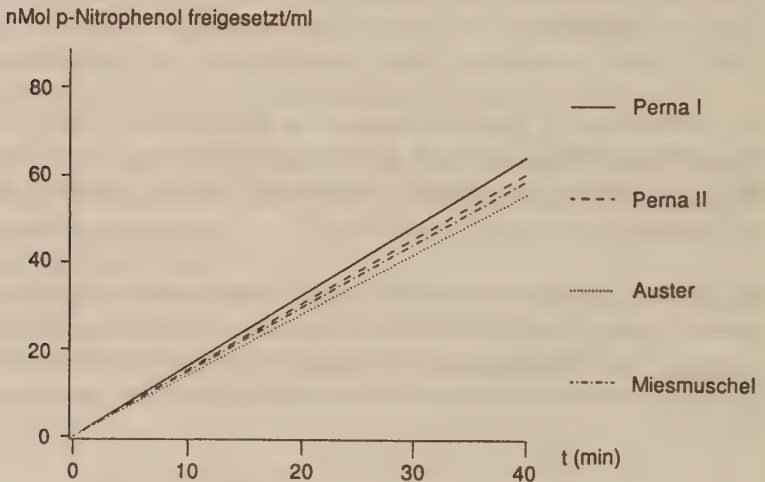


Abb. 42 : Freisetzung von p-Nitrophenol aus NPh- α -L-fucopyranosid durch die α -L-Fucosidase-Aktivität in vier Muschelextrakten

4.1.2. Beschreibung des enzymatischen Testsystems

Die wasserlöslichen Enzyme wurden nach einstündigem Rühren des Extrakts (E.4.1.) in kaltem Wasser vom wasserunlöslichen Muschelpulveranteil durch Zentrifugation abgetrennt, im Vakuum getrocknet und in einer definierten Menge destillierten Wassers wiederaufgenommen. Diese Enzymlösung wurde mit der Substratlösung inkubiert. Je nach Reaktionsgeschwindigkeit wurde die Hydrolyse mit einem alkalischen Puffer zu unterschiedlichen Inkubationszeiten abgestoppt. Die Auswertung erfolgte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm. Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität der Enzymlösungen wurde der Proteingehalt nach LOWRY bestimmt.

Tab. 22 : Bestimmung des Proteingehaltes der Extraktlösungen :

Muschelextrakte	Proteingehalt
Perna I	262 µg/ml
Perna II	349 µg/ml
Miesmuschel	564 µg/ml
Auster	272 µg/ml

4.1.3. Nachweis und quantitativer Vergleich glykohydrolytischer Aktivität in verschiedenen Muscheln

4.1.3.1. β -D-Glucosidase-Aktivität

Muschel-extrakt	tot. Aktivität in pkat	Spezifische Aktivität in μ kat/mg	rel. spezif. Aktivität in %
Perna I	17,0	356	100
Perna II	23,3	320	89,9
Miesmuschel	18,6	132	37,1
Auster	41,4	608	170,8

Reaktionsbedingungen :

0,1 M Natriumacetatpuffer pH 5,0 + BSA 0,1 mg/ml 175 μ l

Enzymlösung 25 μ l

Substrat : p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid 2 mg/ml 50 μ l

Abstoppen mit 0,5 M Natriumborat pH 10,0 500 μ l

Inkubationsdauer 15 min

4.1.3.2. α -L-Fucosidase-Aktivität

Muschel-extrakt	tot. Aktivität in pkat	Spezifische Aktivität in μ kat/mg	rel. spezif. Aktivität in %
Perna I	39,3	600	100
Perna II	36,9	423	70,5
Miesmuschel	35,9	255	42,5
Auster	33,9	499	83,1

Reaktionsbedingungen :

0,1 M Natriumacetatpuffer pH 5,0 + BSA 0,1 mg/ml 350 μ l

Enzymlösung 25 μ l

Substrat : p-Nitrophenyl- α -L-fucopyranosid 1 mg/ml 100 μ l

Abstoppen mit 0,5 M Natriumborat pH 10,0 1000 μ l

Inkubationsdauer 40 min

4.1.3.3. β -D-Galaktosidase-Aktivität

Muschel- extrakt	tot. Aktivität in pkat	Spezifische Aktivität in μ kat/mg	rel. spezif. Aktivität in %
Perna I	73,2	1118	100
Perna II	67,8	778	69,6
Miesmuschel	41,8	296	26,4
Auster	65,5	964	86,3

Reaktionsbedingungen :

0,1 M Natriumcitratpuffer pH 3,7 + BSA 0,1 mg/ml 350 μ lEnzymlösung 25 μ lSubstrat : p-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid 2 mg/ml 100 μ lAbstoppen mit 0,5 M Natriumborat pH 10,0 1000 μ l

Inkubationsdauer 20 min

4.1.3.4. β -D-Xylosidase-Aktivität

Muschel- extrakt	tot. Aktivität in pkat	Spezifische Aktivität in μ kat/mg	rel. spezif. Aktivität in %
Perna I	4,7	72	100
Perna II	7,6	87	122,2
Miesmuschel	1,8	13	18,3
Auster	5,9	87	121,3

Reaktionsbedingungen :

0,1 M Natriumcitratpuffer pH 3,7 + BSA 0,1 mg/ml 175 μ lEnzymlösung 25 μ lSubstrat : p-Nitrophenyl- β -D-xylopyranosid 3 mg/ml 50 μ lAbstoppen mit 0,5 M Natriumborat pH 10,0 500 μ l

Inkubationsdauer 35 min

4.1.3.5. α -L-Arabinosidase-Aktivität

Muschel- extrakt	tot. Aktivität in pkat	Spezifische Aktivität in μ kat/mg	rel. spezif. Aktivität in %
Perna I	8,0	123	100
Perna II	9,0	104	84,3
Miesmuschel	4,2	29	23,9
Auster	5,6	82	66,5

Reaktionsbedingungen :

0,1 M Natriumcitratpuffer pH 3,7 + BSA 0,1 mg/ml 175 μ l

Enzymlösung 25 μ l

Substrat : p-Nitrophenyl- α -L-arabinopyranosid 5 mg/ml 50 μ l

Abstoppen mit 0,5 M Natriumborat pH 10,0 500 μ l

Inkubationsdauer 50 min

4.1.3.6. β -D-Mannosidase-Aktivität

Muschel- extrakt	tot. Aktivität in pkat	Spezifische Aktivität in μ kat/mg	rel. spezif. Aktivität in %
Perna I	8,8	135	100
Perna II	12,4	143	106,1
Miesmuschel	5,4	39	28,7
Auster	3,7	55	41,1

Reaktionsbedingungen :

0,1 M Natriumcitratpuffer pH 3,7 + BSA 0,1 mg/ml 175 μ l

Enzymlösung 25 μ l

Substrat : p-Nitrophenyl- β -D-mannopyranosid 2 mg/ml 50 μ l

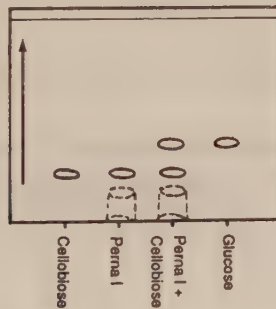
Abstoppen mit 0,5 M Natriumborat pH 10,0 500 μ l

Inkubationsdauer 50 min

4.1.3.7. β -D-Cellulase-Aktivität

Bevor die Enzymaktivität quantitativ mit einem p-Nitrophenyl-Derivat bestimmt wurde, führten wir orientierend eine Inkubation mit Cellobiose durch. Die Spaltung in Glucoseeinheiten wurde mit Dünnschichtchromatographie nachgewiesen, wobei mitinkubierte Lösungen von Enzymen und Substanzen als Referenz dienten (Abb. 43).

Abb. 43 : Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Cellulase-Aktivität



Quantitative Bestimmung mit einem p-Nitrophenyl-Derivat

Muschel-extrakt	tot. Aktivität in μ kat	Spezifische Aktivität in μ kat/mg	rel. spezif. Aktivität in %
Perna I	6,4	98	100
Perna II	8,7	100	102,1
Miesmuschel	3,2	23	23,4
Auster	6,0	88	90,3

Reaktionsbedingungen :
 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 5,0 + BSA 0,1 mg/ml 175 μ l
 Enzymlösung 25 μ l
 Substrat : p-Nitrophenyl- β -D-cellobiosid 5 mg/ml 50 μ l
 Abstoppen mit 0,5 M Natriumborat pH 10,0 500 μ l
 Inkubationsdauer 60 min, Temperatur 37°C

4.1.3.8. N-Acetyl- β -D-glucosaminidase-Aktivität

Muschel-extrakt	tot. Aktivität in pkat	Spezifische Aktivität in μ kat/mg	rel. spezif. Aktivität in %
Perna I	21,6	330	100
Perna II	15,2	175	52,9
Miesmuschel	53,2	377	114,3
Auster	24,9	367	111,2

Reaktionsbedingungen :

0,15 M NaCl + 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 6,5 + BSA 0,1 mg/ml 675 μ l

Enzymlösung 25 μ l

Substrat : p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminidin 5 mg/ml 50 μ l

Inkubationsdauer 5-10 min

4.1.3.9. N-Acetyl- β -D-galaktosaminidase-Aktivität

Muschel-extrakt	tot. Aktivität in pkat	Spezifische Aktivität in μ kat/mg	rel. spezif. Aktivität in %
Perna I	61,4	937	100
Perna II	29,4	337	35,0
Miesmuschel	94,8	672	71,7
Auster	77,7	1142	121,9

Reaktionsbedingungen :

0,1 M Natriumcitratpuffer pH 3,7 175 μ l

Enzymlösung 25 μ l

Substrat : p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-galaktosaminidin 0,5 mg/ml 50 μ l

Abstoppen mit 0,5 M Natriumborat pH 10,0 500 μ l

Inkubationsdauer 10 min

4.1.3.10. β -D-Glucuronidase-Aktivität

Muschel-extrakt	tot. Aktivität in pkat	Spezifische Aktivität in μ kat/mg	rel. spezif. Aktivität in %
Perna I	12,2	186	100
Perna II	5,0	57	30,9
Miesmuschel	15,7	111	59,8
Auster	10,8	158	85,3

Reaktionsbedingungen :

0,1 M Natriumcitratpuffer pH 3,7 + BSA 0,1 mg/ml 175 μ lEnzymlösung 25 μ lSubstrat : p-Nitrophenyl- β -D-glucuronid 2 mg/ml 50 μ lAbstoppen mit 0,5 M Natriumborat pH 10,0 500 μ l

Inkubationsdauer 35 min

4.1.3.11. β -D-Galakturonidase-Aktivität

Muschel-extrakt	tot. Aktivität in pkat	Spezifische Aktivität in μ kat/mg	rel. spezif. Aktivität in %
Perna I	7,1	108	100
Perna II	6,9	79	73,1
Miesmuschel	9,2	65	60,3
Auster	4,0	60	55,3

Reaktionsbedingungen :

0,1 M Natriumcitratpuffer pH 3,7 + BSA 0,1 mg/ml 175 μ lEnzymlösung 25 μ lSubstrat : p-Nitrophenyl- β -D-galakturonid 5 mg/ml 50 μ lAbstoppen mit 0,5 M Natriumborat pH 10,0 500 μ l

Inkubationsdauer 50 min

In allen vier Muschelextrakten konnten die elf untersuchten Enzymaktivitäten nachgewiesen werden. Die enzymatischen Hauptaktivitäten lagen in der hydrolytischen Abspaltung von β -D-Glucose, α -L-Fucose, β -D-Galaktose, N-Acetyl- β -D-glucosamin und N-Acetyl- β -D-galaktosamin. Von den Pernaextrakten zeigte Perna I eindeutig die höhere enzymatische Aktivität im Vergleich mit Perna II. Für die Miesmuschel und Auster wurden je nach Glykosidasereaktion stark variierende Werte gefunden.

Bei der Überprüfung der Enzymaktivitäten in den Ammoniumsulfatfällungen und Cetylpyridiniumüberständen der übrigen nicht komplementaktiven Präparate fanden wir zum Teil noch höhere Glykosidaseaktivitäten.

4.2. Prüfung von Muschelextrakten auf Sulfatase-Aktivität

Da HUNT 1970 über den Nachweis einer Sulfatase in Invertebraten berichtet hatte und die Komplementaktivität bei sulfatierten Polysacchariden mit dem Sulfatierungsgrad korreliert (JEPSEN *et al.* 1987), prüften wir die Muschelextrakte auf Sulfatase-Aktivität. Als Substrat wurde p-Nitrophenylsulfat verwendet. Wir erniedrigten die Inkubationstemperatur auf 25°C und arbeiteten mit hohen Konzentrationen des labilen Substrats. Die enzymatische Aktivität der vier Muschelextrakte wurde in zwei verschiedenen Puffersystemen in sehr kurzen Zeitabständen gegen eine Kontrollreaktion ohne Protein gemessen.

Unter den gewählten Reaktionsbedingungen konnte lediglich eine nicht enzymatische Sulfatabspaltung in Analyse- und Kontrollreaktion nachgewiesen werden.

4.3. Prüfung von Muschelextrakten auf proteolytische Aktivität

4.3.1. Allgemeine Proteasenaktivität

Wir verwendeten hierzu als Substrat Azocoll[®], ein Proteingemisch aus Kuhhaut mit kovalent gebundenem Azofarbstoff. Der Farbstoff wird durch Proteasen abhängig von ihrer enzymatischen Umsatzrate freigesetzt, von nativem Azocoll[®] Proteingemisch abgetrennt und spektrophotometrisch bei 520 nm bestimmt.

Die optimalen Versuchsbedingungen wurden mit Pronase als Referenz und Puffersystemen verschiedener Wasserstoffionenkonzentrationen festgelegt. Beim Einsatz von je 100 - 200 µl Enzymlösung (C.4.1.2.) konnte bei allen vier Extrakten auch nach langer Inkubationsdauer bei keinem der eingesetzten pH-Werte eine Spaltung von Azocoll® nachgewiesen werden.

4.3.2. Bestimmung der Trypsin-Aktivität von Muschelextrakten

Die Endopeptidase Trypsin spaltet Proteine und Peptide bevorzugt an der Amidbindung von Arginin- und Lysinresten. Die tryptische Aktivität von Enzymen kann über den Abbau von Hämoglobin oder Casein, bzw. über die Hydrolyse synthetischer Substrate, bestimmt werden.

Wir verwendeten ein Aminosäuresubstrat mit einer zentralen Arginineinheit, die mit einem Benzoylrest und 4-Nitroanilin substituiert war. Unabhängig vom Substituenten sind diese Substrate nicht trypsinspezifisch, da sie auch von anderen Serin- und Thiolproteasen gespalten werden können. Eine genauere Abklärung ist nur durch den Einsatz von Trypsininhibitoren möglich.

Die Enzymlösung wurde mit Puffer und teilweise mit Inhibitor vorinkubiert und dann mit der Substratlösung versetzt. Die Menge des freigesetzten Nitroanilins wurde mit Hilfe der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm kontinuierlich bestimmt.

Die proteolytische Aktivität der vier Muschelextrakte unter den mit Trypsin überprüften Versuchsbedingungen ist aus Tabelle 23 ersichtlich.

Tab. 23 : Proteolytische Aktivität der vier Muschelextrakte gegenüber BZ-L-ARG-4NA in Triethanolaminpuffer

Muschel- extrakt	tot. Aktivität in pkat	Spezifische Aktivität in μ kat/mg	rel. spezif. Aktivität in %
Perna I	6,5	50	100
Perna II	7,4	70	140,7
Miesmuschel	3,6	13	25,6
Auster	6,5	48	96,4

Reaktionsbedingungen :

0,2 M Triethanolaminpuffer pH 7,8 750 μ l

Enzymlösung 50 μ l

Substrat : BZ-L-ARG-4NA 3 mmol/l 200 μ l

Inkubationsdauer 10 min, Temperatur 25°C

Um die Spezifität dieser Hydrolysen festzustellen, fügten wir den Trypsininhibitor Ovomucoid in einer Menge zur Reaktionslösung, die bei hochaktivem Trypsin eine 100 %ige Hemmung herbeiführt. Die Nitroanilin-Abspaltung wurde durch die Pernaextrakte Perna I und II in einem Zeitraum von 10 Minuten nur um 12,4 % verringert. Daher ist die beobachtete enzymatische Aktivität gegenüber dem verwendeten Substrat nicht auf Trypsin oder ein nah verwandtes Enzym zurückzuführen.

4.3.3. Bestimmung der Papain-Aktivität von Muschelextrakten

Das Enzym Papain spaltet ein breiteres Spektrum von Peptidbindungen als Trypsin und wird daher häufig für die vollständige Proteolyse eingesetzt. Auch für dieses Enzym sind Benzoyl-L-arginin-Derivate (z.B. BZ-L-ARG-4NA) die geeigneten Substrate.

Da Papain für seine katalytische Aktivität eine freie Sulfhydrylgruppe benötigt, muß ein Reduktionsmittel wie Cystein dem Reaktionsansatz zugegeben werden. Als aktivitätsstabilisierender Zusatz wird außerdem Ethylendiamintetraessigsäure verwendet. Mit diesem veränderten Reaktionsansatz wurde nochmals eine Untersuchung von proteolytischer Aktivität in den vier Muschelextrakten durchgeführt.

Tab. 24 : Proteolytische Aktivität der vier Muschelextrakte gegenüber BZ-L-ARG-4NA in Phosphat-Cystein-EDTA Puffer

Muschel- extrakt	tot. Aktivität in pkat	Spezifische Aktivität in μ kat/mg	rel. spezif. Aktivität in %
Perna I	5,7	44	100
Perna II	16,3	94	214,2
Miesmuschel	3,3	12	26,5
Auster	10,6	78	178,7

Reaktionsbedingungen :

0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 6,2 + 2,6 mM Cystein + 0,52 mM EDTA 750 μ l

Enzymlösung 50 μ l

Substrat : BZ-L-ARG-4NA 3 mmol/l 200 μ l

Inkubationsdauer 10 min, Temperatur 25°C

Die unter diesen Bedingungen erhaltene enzymatische Aktivität lag im Vergleich zu den "Trypsin" Werten deutlich höher. Die proteolytische Aktivität der Extrakte scheint demnach eher auf "Papain"-ähnlichen Aktivitäten zu beruhen.

Bei den vier Muschelextrakten traten starke Differenzen bezüglich der als Substrat eingesetzten Nitroanilinderivate auf, wobei der Pernaextrakt Perna II und die Auster am aktivsten waren. Nach diesen enzymatischen Tests scheint die Miesmuschel wenig proteolytische Aktivitäten in einem lyophilisierten Extrakt zu besitzen.

Man kann aus diesen Enzymuntersuchungen ableiten, daß die Isolierung des Glykoproteins PeL2 aus den später zur Verfügung gestellten Pernachargen wegen der Zerstörung der Substanz bei der Aufarbeitung bzw. Lagerung nicht reproduziert werden konnte. Die geglückte Isolierung aus dem Präparat Perna 1 muß daher auf ein anderes Aufarbeitungsverfahren oder andere Lagerungsbedingungen des Extrakts zurückzuführen sein. Um das Glykoprotein auch aus den enzymhaltigen Extrakten isolieren zu können, müßte vorher eine Inaktivierung dieser Enzyme erreicht werden.

5. Versuche zur spezifischen und unspezifischen Hemmung von Glykohydrolasen

5.1. Spezifische Enzymhemmung

Die zur Zeit bekannten Glykosidaseinhibitoren lassen sich nach ihrer Herkunft und Struktur in verschiedene Klassen einordnen.

Die aus Mikroorganismen gewonnenen Glucosidaseinhibitoren Nojirimycin und Acarbose weisen strukturelle Verwandtschaft mit den an der enzymatischen Reaktion beteiligten Substraten auf. Das Nojirimycin aus Streptomycesarten stellt ein glucoseanaloges Molekül dar, wobei das Sauerstoffatom des Pyranoserings durch eine sekundäre Aminogruppe ersetzt ist. Bei der Acarbose aus dem Kulturfiltrat von Actinomyceten handelt es sich um ein Pseudooligosaccharid, das neben dem essentiellen Kernstück (ungesättigter Cyclitolring und ein 4-Amino-4-desoxy-D-chinovose-Rest) zwei (1→4)- α verknüpfte Glucoseeinheiten besitzt.

Die aus höheren Pflanzen isolierten Verbindungen dagegen gehören in der Regel der Klasse der Alkaloide an (Castanospermin, Swainsonine). Eine Übersicht über Strukturen und Hemmspektren findet sich bei FUHRMANN *et al.* 1985 und TRUSCHEIT *et al.* 1981.

Einen weiteren Typ spezifischer Glykosidaseinhibitoren stellen die Aldonolactone mit einer zur Zuckereinheit des Substrates korrespondierenden Konfiguration dar (BARMANN 1969). Sie erreichen ihre maximale Wirkung bei weitgehender Struktur-analogie zwischen Substrateinzelbaustein und Aldonolacton (z.B. α -L-Fucosidase $\rightarrow$ Fuconolacton), können aber auch bei strukturell verwandten Substraten eingesetzt werden (CONCHIE *et al.* 1967, 1968).

Das Hemmspektrum der käuflich erhältlichen Glucono- und Galaktonolactone beschränkt sich auf Glucosidasen, Galaktosidasen und Fucosidasen (BARMANN 1969). Durch die hohe N-Acetylglucosaminidase- und N-Acetylgalaktosaminidase-Aktivität der Extrakte (C.4.1.3.8./9.) und die essentielle Bedeutung von Aminozuckern für Glykoproteinstrukturen war auch eine Hemmung dieser Enzymaktivitäten wünschenswert. Daher synthetisierten wir durch partielle Acetylierung von Glucosaminsäure ein N-Acetylglucosaminolacton und überprüften seine Inhibitoreigenschaften.

Unter den Versuchsbedingungen C.4.1.3.8. wurde die spezifische N-Acetyl- β -D-glucosamidase-Aktivität des Muschelextraktes Perna I bei einem Zusatz von 10^{-3} M N-Acetylglucosaminolacton zu 100 % gehemmt.

Bei niedrigeren Inhibitorkonzentrationen wurde die N-Acetyl- β -D-glucosaminidase-Aktivität des Extrakts noch nicht vollständig gehemmt. Die Hemmwirkung des synthetisierten Lactons blieb bei pH-Werten von 5,0 - 6,5 stabil.

5.2. Unspezifische Enzymhemmung

5.2.1. Hitzedenaturierung

Eine der besten Methoden, ein breites Spektrum von abbauenden Enzymen zu hemmen, ist die Denaturierung von Proteinen durch Hitzeeinwirkung. Wir inkubierten daher den Gesamtextrakt mit vorher erhitztem Puffer und der Substratlösung. Bei 60°C konnte nach 90 Minuten teilweise noch Enzymaktivität nachgewiesen werden. Eine Erhöhung der Temperatur auf 80°C führte nach 35 Minuten nur noch zu einer geringen α -L-Fucosidase- und N-Acetyl- β -D-glucosaminidase-Aktivität.

Mit dem so hitzebehandelten Muschelextrakt *Perna* I wurde ein verkürztes Isolierungsverfahren unter Verzicht auf die Ammoniumsulfatfällungen durchgeführt. Bei sonst unverändertem Isolierungsgang konnte allerdings kein komplementaktives Glykoprotein gewonnen werden. Es ist daher anzunehmen, daß durch die hohe Temperatur nicht nur die abbauenden Enzyme sondern auch der Proteinanteil von PeL2 denaturiert wurde.

5.2.2. Versuche zur Verringerung der katalytischen Aktivität durch Temperatureniedrigung

Die Geschwindigkeit aller enzymatischen Vorgänge ist bei tiefen Temperaturen stark erniedrigt. Diese Erkenntnis wird schon seit längerem zur Aufklärung von Intermediärprodukten enzymatischer Reaktionen eingesetzt (siehe Kryoenzymologie, FINK *et al.* 1979, DOUZOU 1979).

Eine verringerte Substratumsetzungsrate bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt könnte eine Isolierung des aktiven Glykoproteins mit Ionenaustauschchromatographie ermöglichen (siehe C.3.3.).

Um bei diesen Temperaturen in wässrigem Milieu arbeiten zu können, müssen organische, gefrierpunktserniedrigende Lösungsmittel zugesetzt werden. Als Kryoprotektoren kommen Ethylenglykol, Methanol oder Dimethylsulfoxid in Frage. Je nach prozentualen Anteil setzen sie den Gefrierpunkt in unterschiedlichem Ausmaß herab. Wegen der Gefahr der Denaturierung der Glykoproteine und zu hoher Viskosität der Lösung verwendeten wir lediglich einen 30 %igen Zusatz der drei erwähnten Lösungsmittel. Damit erreichten wir eine Gefrierpunktserniedrigung auf -15°C . Da von HUI BON HOA *et al.* 1973, MAUREL *et al.* 1975 Verschiebungen der pH-Werte in den alkalischen Bereich durch Temperaturenniedrigung und gleichzeitigen Einsatz organischer Lösungsmittel gemessen wurden, wählten wir Puffersysteme, die unter den Versuchsbedingungen neutrale pH-Werte erreichten.

Verwendete Lösungsmittelmischungen :

0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 5,4 (RT) + 30 Vol.% Ethylenglykol

0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 5,4 (RT) + 30 Vol.% Methanol

0,01 M Natriumacetatpuffer pH 5,3 (RT) + 30 Vol.% DMSO

Die Puffer wurden auf eine Temperatur von -10°C gebracht und der Extrakt wurde gleichzeitig mit den verschiedenen Substratlösungen hinzugefügt. Die enzymatische Reaktion wurde nach 12 Stunden Rühren durch Einstellen eines alkalischen pH-Wertes abgestoppt. In allen drei Systemen fanden noch Umsetzungen statt, wobei die Enzymaktivitäten bei DMSO, wie auch eine frühere Untersuchung mit β -Glucosidase und β -Galaktosidase (FINK *et al.* 1974, 1975) bestätigte, am stärksten erhalten geblieben waren. Die höchste Restaktivität konnte für die Abspaltung von β -D-Galakturonsäure, N-Acetyl- β -D-glucosamin und β -D-Galaktose gefunden werden.

Durch Bindung des Glykoproteins PeL2 an einen Anionenaustauscher versuchten wir, in einem abgeänderten Isolierungsverfahren bei Temperaturen von -10°C , die aktive Substanz nach dem "Batchverfahren" zu erhalten. Hierunter versteht man die Bindung an suspendierte Gelmaterialien und nachfolgende Elution aus dem Gelbett. Der Muschелеxtrakt Perna I wurde in den drei Lösungsmittelsystemen suspendiert, zentrifugiert, die Überstände wurden an zugefügte Q Sepharose® Fast Flow gebunden. Nacheinander wurden Substanzen von dem Gelmaterial im Becherglas mit Puffer, einem KCl -Stufengradienten und Natronlauge eluiert.

Es wurden sehr geringe Ausbeuten von anionischen Substanzen erzielt, was eventuell auf verminderte Löslichkeit von Proteinen in organischen Lösungsmitteln bei tiefer Temperatur zurückzuführen war (FINK *et al.* 1979). Lediglich eine mit 1 M Kaliumchlorid eluierte Substanz (0,7 mg Ausbeute) zeigte eine schwache antikomplementäre Wirkung im Testsystem CP 1.

Damit war es auch durch Isolierungsverfahren bei Niedrigtemperaturen nicht möglich, das Glykoprotein PeL2 aus dem Extrakt Perna I zu gewinnen.

6. **Darstellung von Polysaccharidfraktionen aus vier verschiedenen Muschel-extrakten**

6.1. Gewinnung der Polysaccharidfraktionen nach Papainhydrolyse und gleichzeitiger Enzyminhibition

Da sich in früheren Versuchen gezeigt hatte, daß die antikomplementäre Aktivität des Glykoproteins PeL2 weder durch Hitzebehandlung noch durch Autoklavieren verändert wurde, und somit die Wirkung dem sulfatierten Zuckeranteil zugeschrieben werden konnte, versuchten wir im folgenden, peptid- bzw. proteinfreie, sulfathaltige Polysaccharide zu gewinnen.

Um Glykohydrolysen während der Anfangsphase der Papainbehandlung auszuschließen, unterwarfen wir das Muschelmateriale zunächst einer Hitzedenaturierung. Sie erfolgte in Puffer 35 Minuten lang bei einer Temperatur von 80°C. Unter diesen Bedingungen wurde Fucoidan als Referenzsubstanz weder im Neutralzuckerteil noch im Sulfatgehalt verändert.

Für die Proteolyse wurde Papain der Pronase vorgezogen, da Papain sich durch ein breiteres Spektrum an Spaltungsmöglichkeiten auszeichnet und sehr hitzeresistent ist (ARNON 1970). Der Proteinabbau findet mit diesem Enzym bevorzugt bei 60-65°C in einem schwach sauren Puffer statt. Dadurch kann die katalytische Aktivität von Glykohydrolasen verringert werden und gleichzeitig die Lactonstruktur der Enzyminhibitoren länger erhalten werden.

Um auch noch eventuell vorhandene temperaturresistente, zuckerabbauende Aktivitäten hemmen zu können, klärten wir in einem Vorversuch, welche Hitzestabilität die Inhibitoren Gluconolacton, Galaktonolacton und N-Acetylglucosaminolacton besitzen. Ebenso wurde Carrageenan als Referenzsubstanz auf Stabilität sowohl bezüglich der Hitze- als auch der Papainbehandlung untersucht. Weder für die Inhibitoren noch für Carrageenan wurden meßbare Veränderungen festgestellt.

Der Hauptversuch wurde mit allen vier Muschelextrakten durchgeführt. Nach der Hitzebehandlung der mit den drei Inhibitoren versetzten Extraktlösungen wurde auf die Temperatur des Papainabbaus abgekühlt und mit Papain inkubiert.

Im Überstand dieser Suspension wurden nach dem Zentrifugieren Proteine mit Trichloressigsäure ausgefällt. Nach Abtrennung des Proteinanteils und Neutralisation des Überstands wurden zwei Alkoholfällungen (1+4) durchgeführt. Das dialysierte Ethanolpräzipitat wurde einer Anionenaustauschchromatographie nach C.3.3. unterworfen (Abb. 44).

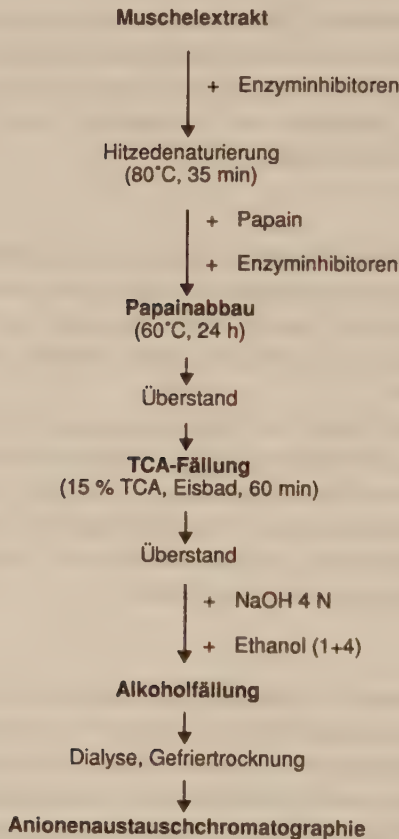


Abb. 44 : Schematische Darstellung des Polysaccharid-Isolierungsganges nach Papainabbau

6.2. Chemische Charakterisierung der Polysaccharidfraktionen

Durch Elution mit Phosphatpuffer wurden aus den vier Muschelrohextrakten ein bis zwei Neutralfraktionen (N1, N2) mit positivem Drehsinn, sowie eine rechtsdrehende (A1) und eine linksdrehende (A2) anionische Fraktion gewonnen. Die mit allen Fraktionen und der Rohfraktion durchgeführten chemischen Analysen sind in den Tabellen 25-28 zusammengestellt. Die angegebenen Werte des Neutralzucker-, Aminosäure- und Proteingehaltes wurden als Mittelwerte aus zwei Versuchen erhalten, während die Sulfat- und Uronsäuregehaltsbestimmungen nur einmal ausgeführt wurden.

Tab. 25 : Muschelextrakt Perna I

	Rohfraktion	N 1	N 2	A 1	A 2
Neutralzucker					
Glucose	54 %	86 %	75 %	26 %	4 %
Aminosäure	2 %	-	1 %	6 %	2 %
Uronsäuren	12 %	13 %	16 %	8 %	5 %
Protein	15 %	-	3 %	14 %	26 %
Sulfatgehalt	3 %	n.t.	n.t.	3 %	1 %

Tab. 26 : Muschelextrakt Perna II

	Rohfraktion	N 1	N 2	A 1	A 2
Neutralzucker					
Glucose	53 %	88 %	86 %	60 %	30 %
Aminosäure	2 %	-	1 %	7 %	3 %
Uronsäuren	11 %	14 %	14 %	10 %	2 %
Protein	8 %	-	2 %	11 %	29 %
Sulfatgehalt	2 %	n.t.	n.t.	2 %	3 %

Tab. 27 : Muschelextrakt Miesmuschel

	Rohfraktion	N 1	N 2	A 1	A 2
Neutralzucker					
Glucose	81 %	86 %	90 %	87 %	28 %
Aminozucker	-	-	-	1 %	3 %
Uronsäuren	14 %	16 %	15 %	12 %	3 %
Protein	5 %	1 %	-	2 %	6 %
Sulfatgehalt	1 %	n.t.	n.t.	3 %	1 %

Tab. 28 : Muschelextrakt Auster

	Rohfraktion	N 1	A 1	A 2
Neutralzucker				
Glucose	60 %	85 %	84 %	n.t.
Aminozucker	-	-	1 %	2 %
Uronsäuren	13 %	15 %	13 %	12 %
Protein	3 %	-	2 %	6 %
Sulfatgehalt	1 %	n.t.	1 %	1 %

Die vier untersuchten Muschelextrakte besitzen eine ähnliche Zusammensetzung. Auffallend ist der hohe Glucosegehalt. Einige Fraktionen enthalten geringe Mengen von Arabinose. Die Uronsäurewerte sind nicht abgesichert, da bei gleichzeitig hohem Glucosegehalt falsch-positive Werte auftreten können (KAKAC *et al.* 1974). Die geringen Sulfatwerte (1-3 %) könnten unter anderem erklären, weshalb keine Komplementaktivität im Testsystem CP 1 erhalten wurde.

Wie bereits vorher an Carrageenan und Fucoidan überprüft, dürfte das Isolierungsverfahren zu keiner Abspaltung von Estersulfatgruppen geführt haben. Zwar sind am Stickstoff gebundene Sulfatgruppen leicht hydrolysierbar (DANISHEFSKY 1965), doch benötigte man hierzu verdünnte Salzsäure (0,04 N) und eine Hydrolysedauer von zwei Stunden (100°C).

Um einen Verlust an sulfatierten Zuckerbruchstücken völlig auszuschließen, wurde die erste Dialyselösung ebenfalls analysiert. Sie enthielt nur 2,3 % Glucose und 1,4 % Sulfat.

Diese Ergebnisse zeigen erneut, daß aus den zur Verfügung stehenden vier neuen Muschelextrakten mit den von uns angewendeten Verfahren keine komplementaktiven, sulfatierten Polysaccharide isoliert werden können. Die in einer nicht veröffentlichten Untersuchung von GRESSNER (1987) aufgrund von Hydrolyseergebnissen postulierten hohen Konzentrationen an Chondroitinsulfat und Heparansulfat im Trockenextrakt der Muschel *Perna canaliculus* konnten wir für die von uns untersuchten Pernachargen nicht bestätigen.

7. Chemische und pharmakologische Untersuchungen eines neutralen Glucans PeN1 aus dem Muschelextrakt Perna I

7.1. Gewinnung des Glucans PeN1

Der auffallend hohe Anteil an neutralen Glucanen, der nach dem Papainabbau in allen vier Muschelextrakten gefunden wurde, veranlaßte uns, diese Polysaccharide in reiner Form zu isolieren und ihre biologische Aktivität zu untersuchen. Nach Hitze-denaturierung des Proteinanteils isolierten wir aus dem Muschelextrakt Perna I durch Anionenaustauschchromatographie an Q Sepharose® Fast Flow neutrale und saure Polysaccharide. Mit Phosphatpuffer wurden zwei neutrale Fraktionen mit positivem Drehsinn eluiert (PeN1, PeN2). Durch nachfolgenden Kochsalzgradienten wurden weitere vier Fraktionen mit unterschiedlichem Drehsinn isoliert (PeA1, PeA2, PeA3, PeA4). Zwei weitere Fraktionen erhielten wir durch eine Elution mit Natronlauge (PeL1 pH 9, PeL2 pH 11) (Abb. 45).

Der prozentuale Protein- und Zuckergehalt der erhaltenen Fraktionen ist in Tabelle 29 zusammengestellt.

Tab. 29: Zucker- und Proteinzusammensetzung der Anionenaustauscherfraktionen des Muschelextraktes Perna I

Fraktion	Glucose in %	andere Neutral- zucker in %	Protein in %
PeN1	91,4	-	0,3
PeN2	57,2	in Spuren Fuc, Gal, Man	33,7
PeA1	56,0	in Spuren Fuc, Gal, Man	32,5
PeA3	14,4	in Spuren Fuc, Gal	60,6
PeA4	6,5		n.t.
PeL1	12,5	Fuc 1,1 %, Gal	42,6
PeL2	4,4	Fuc, Gal	79,6

PeA2, PeA4 : wegen geringer Ausbeute nicht getestet

In dem Screeningtestsystem des Klassischen Weges (CP 1) war für alle Fraktionen keine Reduktion der Hämolyse meßbar. Nach einer Vorinkubation mit konzentriertem Serum erwiesen sich dagegen beide Neutralfraktionen vor allem im Alternativen Komplementweg (AP 2, B.3.3.2.) als aktiv. Da von Glucanen neben immunstimulierenden und tumorhemmenden Wirkungen (OKUDA *et al.* 1972) auch antiphlogistische Aktivitäten bekannt sind, konzentrierten wir unsere chemischen und pharmakologischen Untersuchungen auf das proteinfreie Glucan PeN1.

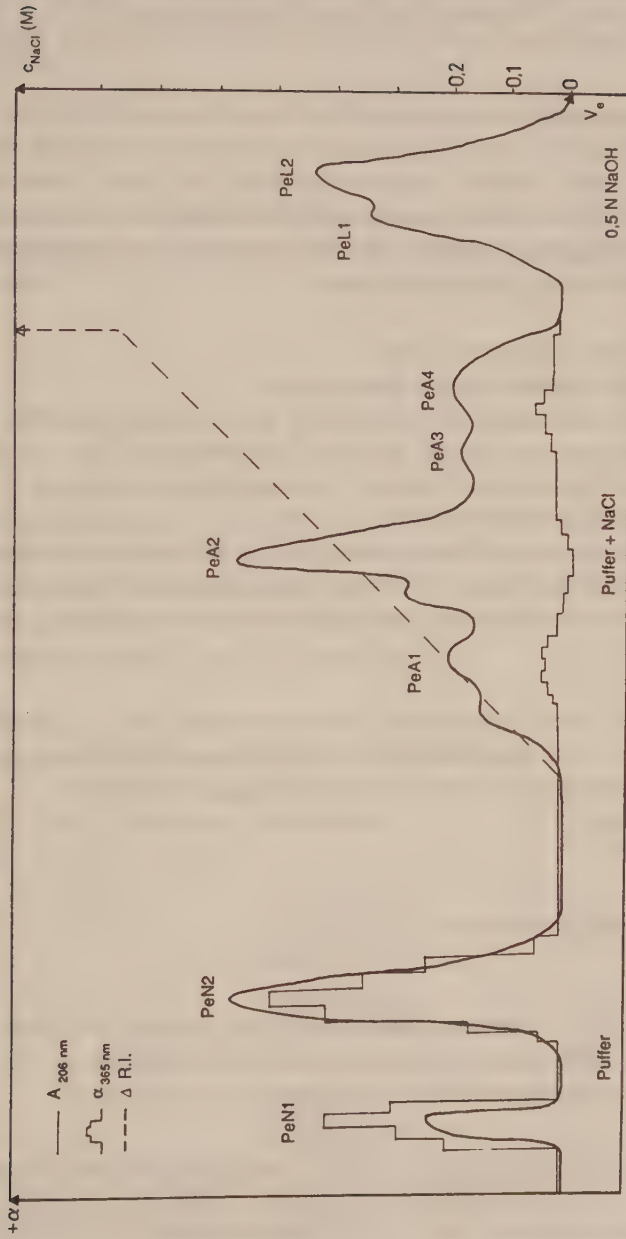


Abb. 45 : Anionenaustauschchromatographie des Muschelextraktes Perna l an Q Sepharose® Fast Flow

7.2. Strukturaufklärung des Glucans PeN1 und Identifizierung als Glykogen

7.2.1. Chemische Zusammensetzung

Die Substanz PeN1 konnte in mehreren parallel durchgeführten Aufarbeitungen in gleicher Zusammensetzung mit Hilfe des oben beschriebenen Isolierungsverfahrens in einer Ausbeute von ca. 2 % gewonnen werden.

Die C/H/N/ - Analyse ergab folgende Werte :

Kohlenstoff 39,6 %, Wasserstoff 6,3 %, Stickstoff 0,2 %

Bei der gaschromatographischen Bestimmung der Monosaccharide über ihre Alditolacetate konnte nur Glucose in einem Prozentsatz von 90 - 92 % als Zuckerbestandteil nachgewiesen werden. Dünnschichtchromatographisch wurden keine Uronsäuren detektiert.

Bei einem Anteil von 0,3 % Protein (nach LOWRY) und 0,98 % Aminozucker (nach ELSON-MORGAN), die durch den geringen Stickstoffgehalt der Elementaranalyse bestätigt wurden, konnte die Substanz PeN1 als hochgereinigtes Glucan identifiziert werden.

Die spezifische Drehung des Glucans PeN1 wurde nach DAB 9 in destilliertem Wasser bei $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ bestimmt (Natrium D-Linie 589 nm). Bei einer Konzentration von 0,1 % bewirkte das Glucan eine starke Rechtsdrehung ($\alpha_D^{20} = + 166^\circ$).

7.2.2. Fluoreszenzspektroskopie

Um die mehrfach für Glykogene beschriebene Aggregatbildung (GEDDES 1985) zwischen dem Kohlehydratteil und geringen Mengen an Proteinen oder Enzymen auszuschließen, wurde das Glucan fluoreszenzspektroskopisch untersucht.

Jedes Protein bzw. Enzym besitzt in Form seiner aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin natürliche Chromophore. Der Einbau dieser Aminosäuren in ein Protein führt im Vergleich mit freien Aminosäuren zu einer deutlichen Blauverschiebung, die auf die Umgebungsveränderung zurückzuführen

ist. Man erhält das Emissionsspektrum von gebundenem Tryptophan im Bereich von 330-340 nm. Da innerhalb eines Proteins die Intensität dieser Bande diejenigen von Tyrosin und Phenylalanin (STRYER 1968) überstrahlt, wird speziell Tryptophan nachgewiesen.

Eine gepufferte Lösung des Glucans PeN1 wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt und das Fluoreszenzemissionsspektrum im Bereich von 290-390 nm aufgenommen. Über ihre Fluoreszenzstrahlung konnten keine aromatischen Aminosäuren nachgewiesen werden. Damit lag der eventuell vorhandene Proteingehalt des Glykogens aus Perna unter der Nachweisgrenze dieser Methode (10 pg Tryptophan).

7.2.3. Methylierungsanalyse

Die Methylierungsanalyse wurde nach der HAKOMORI-Methode mit dem acetylierten Glucan durchgeführt. Die partiell acetylierten Alditole wurden über GC - MS identifiziert (Abb. 46) und mit Literaturwerten verglichen (JANSSON *et al.* 1976). Die molaren Verhältnisse und charakteristischen MS-Bruchstücke der detektierten Hauptverbindungen sind in Tabelle 30 zusammengestellt.

Tab. 30 : Methylierungsanalyse des Glucans PeN1

Peak	molare Zusammensetzung*	Alditolacetate	Charakteristische Bruchstücke (m/e)
1	0,11	1,5-Di-O-acetyl- -2,3,4,6-tetra-O- methylhexitol	71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205
2	1,00	1,4,5-Tri-O-acetyl- -2,3,6-tri-O-methyl- hexitol	71, 87, 99, 101, 113, 117, 129, 131, 143, 161, 173, 233
3	0,28	1,4,5,6-Tetra-O- acetyl-2,3-di-O- methylhexitol	85, 87, 99, 101, 117, 127, 147, 159, 161, 201, 261

* Die Werte für die molare Zusammensetzung wurden nach SWEET (1975) korrigiert.

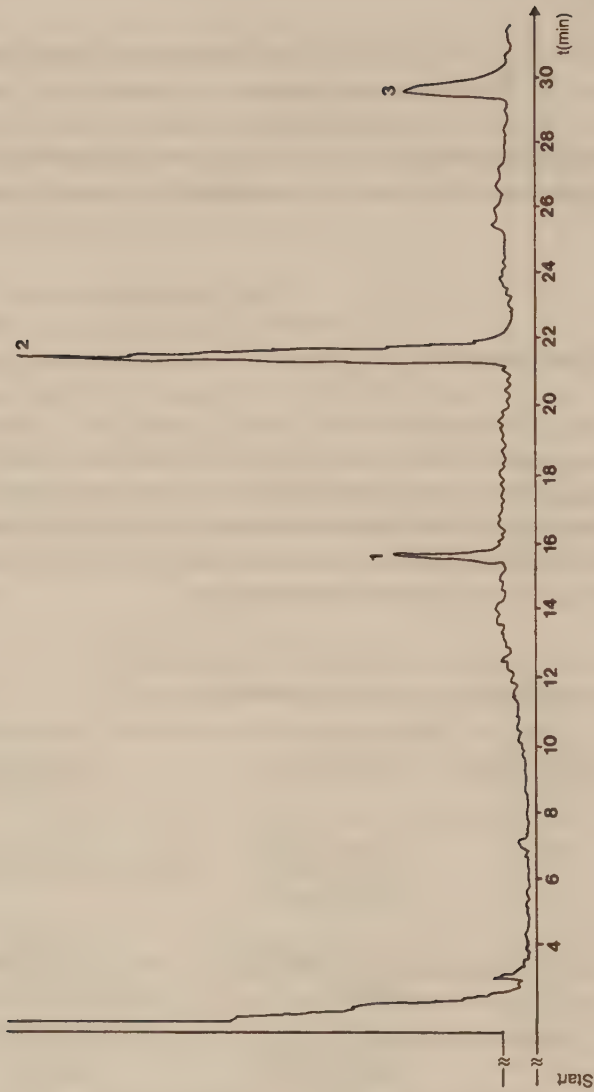


Abb. 46: GC partiell methylierter Aldiolacetate von PeN1

Der im GC dominierende Peak 2 resultierte aus einem 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylhexitol, so daß eine (1→4) verknüpfte, pyranosidische Glucose oder eine (1→5) verknüpfte, furanosidische Glucose vorliegen sollte. Durch Vergleich der Retentionszeiten wurde der Peak als (1→4) verknüpfte Glucose identifiziert. Das 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylhexitol (Peak 1) muß aufgrund von Literaturdaten (JANSSON *et al.* 1976) von einer terminalen pyranosidischen Glucose stammen.

Peak 3 erwies sich als Alditolacetat einer 1,4,6-verzweigten Glucose und stellte damit die einzige Verknüpfungsstelle dar. Aus der molaren Zusammensetzung ergaben sich für die Hauptkette (1→4)-verknüpfte Glucoseeinheiten, die an ungefähr jedem fünften Baustein eine (1→6) Verzweigungsstelle besitzt. Damit handelt es sich bei dem Polysaccharid PeN1 um ein verzweigtes, aus (1→4)-D-Glucoseresten zusammengesetztes Glucan.

7.2.4. ^{13}C - NMR - Spektroskopie

Die Interpretation des ^{13}C -NMR-Spektrums erfolgte durch Vergleich mit methylierten Monosacchariden und mit Oligosacchariden ähnlicher oder verwandter Struktur (BOCK *et al.* 1983, USUI *et al.* 1973). Bei fast allen Glucanen mit den verschiedensten Verknüpfungsarten treten deutliche Tieffeldverschiebungen des β -anomeren C-1 gegenüber der α -anomeren Form auf. Während α -verknüpfte anomere Kohlenstoffe in der Region von 97,5-101 ppm aufgefunden werden, liegen die korrespondierenden β -Werte bei 104-105 ppm.

Das Signal des Polysaccharides PeN1 bei 99,89 ppm konnte damit eindeutig dem anomeren Kohlenstoffatom einer pyranosidischen α -D-Glucose zugeordnet werden (Abb. 47). Auch die übrigen Signale zeigten gute Übereinstimmung mit dem Referenzspektrum eines mit Hilfe von β -Amylase abgebauten Glykogens aus der Kaninchenleber (β -Grenzextrin). Das Bindungskohlenstoffatom in Position C-4 geht beim Pernaglykogen bei 77,35 ppm, im Grenzextrin bei 78,1 ppm in Resonanz. Auch die anderen Kohlenstoffresonanzen von PeN1 entsprachen den Referenzwerten. Da trotz einer sehr langen Aufnahmedauer des Spektrums keine höhere Auflösung erreicht werden konnte, war eine Zuordnung der 1,4,6- verzweigten Glucosereste nicht möglich. Während die bisher ermittelte Struktur eher auf ein einfacher gebautes Polysaccharid hindeutete, wies das ^{13}C -NMR-Spektrum auf ein sehr hohes Molekulargewicht hin.

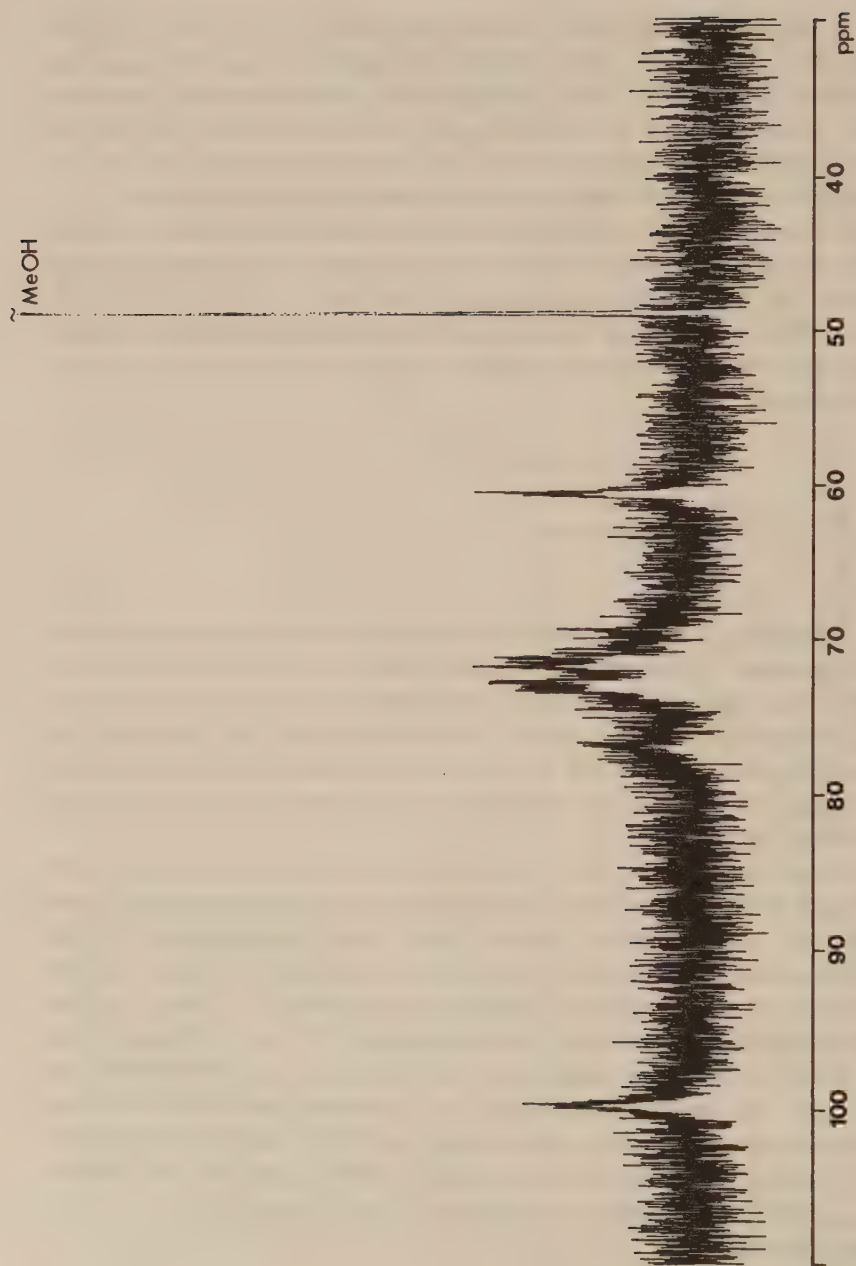


Abb. 47: ^{13}C -NMR-Spektrum des Glucans PeN1

Tab. 31 : ^{13}C -NMR Daten des Glykogens PeN1 im Vergleich zu Maltotriose und β -Grenzdextrin (USUI *et al.* 1973)

Substanz	Chem. Verschiebung in ppm					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Maltotriose	101,1	73,1	74,7	78,5	72,7	62,4
β -Grenzdextrin (Kaninchenleber)	100,6	72,6	74,3	78,1	72,6	62,1
(1 $\rightarrow$ 4) verknüpfte Glucose aus PeN1	99,9	71,3	73,0	77,4	71,9	60,6

Nach diesen Ergebnissen handelt es sich bei dem neutralen Polysaccharid PeN1 um ein (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Glucan mit einer hohen Anzahl von (1 $\rightarrow$ 6) Verzweigungspunkten. Es gehört damit zu den Glykogenen, die als Speichersubstanzen und Energielieferanten vieler tierischer Organismen bekannt sind. Im Gegensatz zu den Glykogenen anderer Muscheln mit einer Kettenlänge von 10-12 Glucoseeinheiten (HUNT 1970) zeichnete sich PeN1 durch eine mittlere Kettenlänge von 5-6 Glucosebausteinen aus. Damit ergibt sich ein hoch verzweigter Aufbau, wie er in Abb. 48 im Vergleich zu anderen Glykogenen dargestellt ist.

Abb. 48 : Glykogenstrukturen

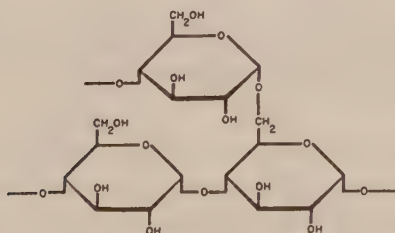


Abb. 48a : Chemische Basisstruktur

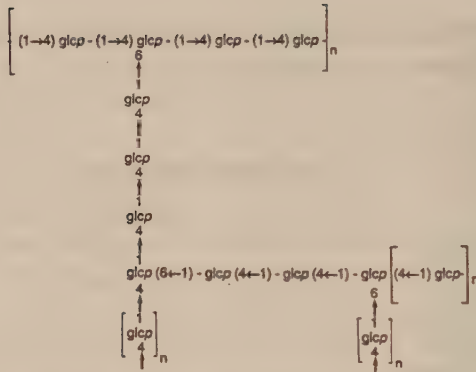


Abb. 48b : Strukturvorschlag für Glykogen PeN1

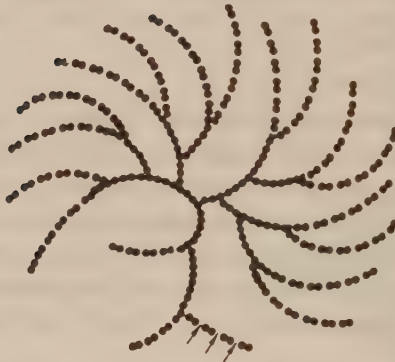


Abb. 48c : Strukturvorschlag nach LEHNINGER 1977

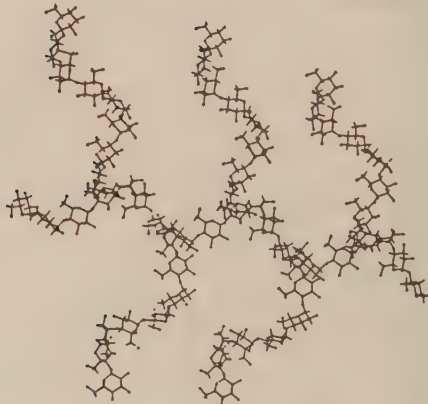


Abb. 48d : Dreidimensionale Glykogenstruktur nach THORN *et al.* 1984

7.2.5. Molekulargewichtsbestimmung

Bei der Chromatographie des Glykogens PeN1 an verschiedenen Gelfiltrationsmaterialien mit breitem Trennbereich wurde die Substanz nur im Ausschlußvolumen eluiert. Dadurch wurde ein zweiter Hinweis auf ein sehr hohes Molekulargewicht gegeben.

Im allgemeinen bewegt sich das Molekulargewicht von Glykogenen bei den Invertebraten in einem Bereich von $0,1 - 5,0 \cdot 10^8$ D (HUNT 1970), der speziesabhängig, umwelt- und zyklusbedingt stark variieren kann. Da das Isolierungsverfahren außerdem die Höhe des Molekulargewichtes beeinflußt, führen drastische Methoden wie Extraktion mit heißer Lauge oder Verfahren mit Trichloressigsäure oder Dimethylsulfoxid zu einheitlichen, aber teils abgebauten Glykogenen.

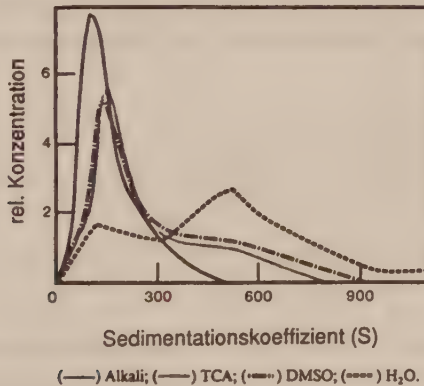


Abb. 49 : Verteilung der Sedimentationskoeffizienten von verschieden extrahierten Glykogenen aus derselben Kaninchenlebercharge (GEDDES 1985)

Bei einer Kaltwasserextraktion mit gleichzeitiger enzymatischer Inaktivierung durch Phenole konnte eine extreme Polydispersität mit Anteilen sehr hochmolekularer Substanz beobachtet werden, die eher dem nativen Zustand entspricht (GEDDES 1985). Aufgrund der von uns durchgeführten Heißwasserextraktion war eine polydisperse Verteilung des Molekulargewichts mit einem mittleren Sedimentationskoeffizienten im Bereich von 200 - 300 S zu erwarten.

7.2.5.1. Analytische Ultrazentrifugation

Das Verhalten von Polysacchariden in der Ultrazentrifuge wird üblicherweise mit der sogenannten Schlierenoptik über den Brechungsindex verfolgt. Für unsere Versuche stand eine Ultrazentrifuge mit UV-Absorptionsmeßzelle zur Verfügung. Proteine, die bei einer Detektionswellenlänge von 240-280 nm die Resultate verfälschen könnten, waren über eine quantitative Proteinbestimmung nach LOWRY und die Fluoreszenzspektroskopie ausgeschlossen worden. Daher konnte die opaleszente Glykogenlösung über die Streulichtmessung bei einer Wellenlänge von 272 nm detektiert werden.

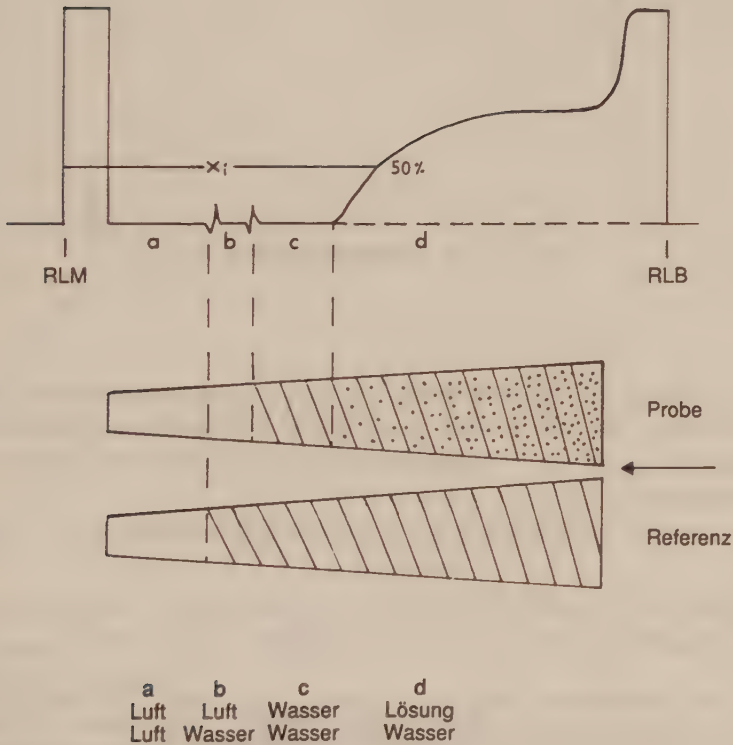
Als Analysentyp benutzten wir die Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse, bei der aufgrund des hohen Zentrifugalfeldes die Diffusion gegenüber der gerichteten Sedimentation vernachlässigt werden kann. Der so berechenbare Sedimentationskoeffizient S_{app} ist ein scheinbarer Sedimentationskoeffizient, da er noch vom Druck und Verdünnungseffekt abhängt und auf die Konzentration Null extrapoliert werden muß.

$$S_{app} = \frac{dr/dt}{r \cdot \omega^2}$$

$$1 \text{ Svedberg} = 1 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$$

Als charakteristisches Maß für die Wanderungsgeschwindigkeit dr/dt wird die Verschiebung des 50 % Wertes der Gradientenkurve ("moving boundary") mit der Zeit herangezogen (Abb. 50). Dieser Punkt gibt an, an welcher Stelle noch 50 % derjenigen Konzentration vorhanden sind, die im Augenblick der Aufnahme gerade in der Plateauzone herrscht. Die Auswertung erfolgte über die gemessenen Verschiebungen x_i graphisch nach der Integralform (Berechnung über den $\tan \alpha$ in der Graphik $\lg r$ versus t) (ELIAS 1969).

Abb. 50 : Auswertung von Gradientenkurven ("moving boundary") der analytischen Ultrazentrifuge



Im betrachteten Bereich von 0,5-2,0 mg PeN1/ml wurde keine Konzentrationsabhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten gefunden. Wie erwartet, zeigte die Substanz in Lösung ein polydisperses Verhalten. Das Verteilungsmuster der Sedimentationskoeffizienten entsprach demjenigen anderer schonend extrahierter Glykogene (BUEDING *et al.* 1961) (Abb. 51).

Abb. 51 : Verteilung der Sedimentationskoeffizienten des Glykogens PeN1



Der mittlere Sedimentationskoeffizient im Maximum der Verteilungskurve betrug 240 Svedberg. Dieser Wert wurde zusammen mit dem nachfolgend bestimmten Diffusionskoeffizienten zur Molekulargewichtsberechnung nach der Svedbergformel herangezogen.

7.2.5.2. Laser - Light - Scattering

Da der Teilchendurchmesser einer Substanz mit ihrem Diffusionskoeffizienten korreliert, kann durch Streulichtintensitätsmessungen hochmolekularer Substanzen der für die Berechnung des Molekulargewichtes entscheidende zweite Parameter, der Diffusionskoeffizient, erhalten werden.

In unseren Messungen verwendeten wir als Lichtquelle einen He-Ne-Laser, der auf die wässrige Lösung des Glykogens PeN1 in einer transparenten, temperierten Küvette einstrahlte. Das in einem 90° Winkel gestreute Licht wurde über einen Detektor empfangen und als elektronischer Puls aufgezeichnet.

In Vorversuchen konnten wir die Angaben von GEDDES (1985) bestätigen, der bei Glykogenen eine Konzentrationsunabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten postuliert. In mehreren Meßläufen ermittelten wir einen mittleren Diffusionskoeffizienten

von $5,98 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{sec}$ bei geringem Polydispersitätsgrad (Abb. 52). Verglichen dazu wurden bei den Glykogenen aus der Miesmuschel bzw. Auster (Fa. Sigma) mittlere Diffusionskoeffizienten von $9,3\text{--}9,5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{sec}$ in einer breiten Verteilung gefunden. Damit besitzt das von uns aus der Muschel isolierte Glykogen PeN1 verglichen mit anderen Muschelglykogenen ein wesentlich höheres Molekulargewicht, wobei eine annähernd runde Teilchenform anzunehmen ist.

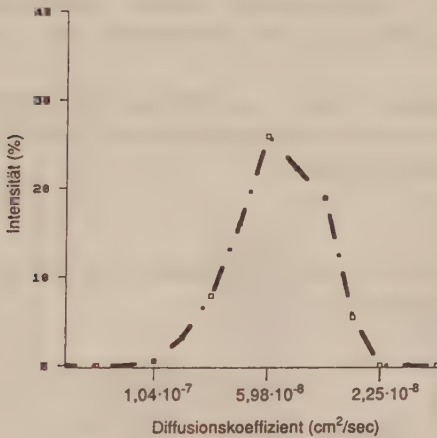


Abb. 52 : Verteilung der Diffusionskoeffizienten des Glykogens PeN1

Die Bestimmung des Molekulargewichts der Substanz PeN1 erfolgte nach Ermittlung der beiden Stoffkonstanten (Sedimentationskoeffizient, Diffusionskoeffizient) über die Svedberg Gleichung.

$$M_{\text{app}} = \frac{R \cdot T \cdot S_{\text{app}}}{D \cdot (1 - v^* \rho)}$$

ρ = Dichte H_2O

v^* = spezif. Volumen der Substanz

Literaturwert : $0,622 \text{ ml/g}$ (O'NEILL *et al.* 1983)

Aus dieser Formel wurde ein mittleres Molekulargewicht von $2,58 \cdot 10^7 \text{ D}$ für das isolierte Glykogen errechnet. Im Vergleich dazu erhielten KJÖLBERG und Mitarbeiter (1963) für das Glykogen der Miesmuschel bei schonender Kaltwasserextraktion ein Molekulargewicht von nur $5 \cdot 10^6 \text{ D}$.

7.3. Pharmakologische Untersuchungen des Glykogens PeN1

7.3.1. Antikomplementäre Wirkungen auf das Gesamtkomplement und Einzelkomponenten

Nachdem sich im vorausgegangenen Screening (1→4)- α -D-Glucane als wirksame Aktivatoren des Alternativen Komplementweges erwiesen hatten, untersuchten wir die Aktivität des Pernaglykogens in den vier Testsystemen (CP 1, CP 2, AP 1, AP 2).

In Gesamtkomplementtestsystemen zeigte das Glykogen nur nach Vorinkubation Aktivität (Tab. 32). Dabei wurden in den Testsystemen CP 2 und AP 2 ähnliche Aktivitäten wie die anderer Glykogene erreicht.

Tab. 32 : Antikomplementäre Wirkung des Glykogens PeN1 auf den Klassischen und Alternativen Weg (CP 2, AP 2)

Konzentration	Reduktion der Hämolyse in % *	
	CP 2	AP 2
1 mg/ml	43,2 $\pm$ 5,0	81,5 $\pm$ 12,8
0,1 mg/ml	5,9 $\pm$ 4,0	2,9 $\pm$ 2,7

* Mittelwerte aus 3-5 Messungen $\pm$ S.D.

Die Amylose mit ihrer hohen Strukturlinearität und geringem Molekulargewicht zeigte, obwohl sie die gleiche (1→4)- α -Bindung besitzt, eine höhere antikomplementäre Aktivität als die Glykogene. Diese Bindungsart ist offensichtlich ein essentielles Strukturmerkmal, da Polysaccharide mit (1→6)- α -Bindungen oder linearer (1→4)- β -Kette keine Komplementwirkung besaßen.

Um den genaueren Angriffsort des Glykogens PeN1 an der Komplementkaskade zu bestimmen, wurden Einzelkomponententestungen durchgeführt. Das hohe Ausmaß von detektierbaren Spaltprodukten der aktivierten Startkomponenten des Alternativen Weges mit Hilfe der Immunfixation deutete daraufhin, daß das Glykogen PeN1 diesen Reaktionsweg beeinflusst. Sowohl die Komponente C3 als auch der Faktor B wurden zu 51 % (rel.) bzw. 72 % (rel.) umgewandelt (Abb. 53). Damit ist ein aktivierender Eingriff des Glykogens in den Alternativen Weg des Komplementsystems bewiesen.

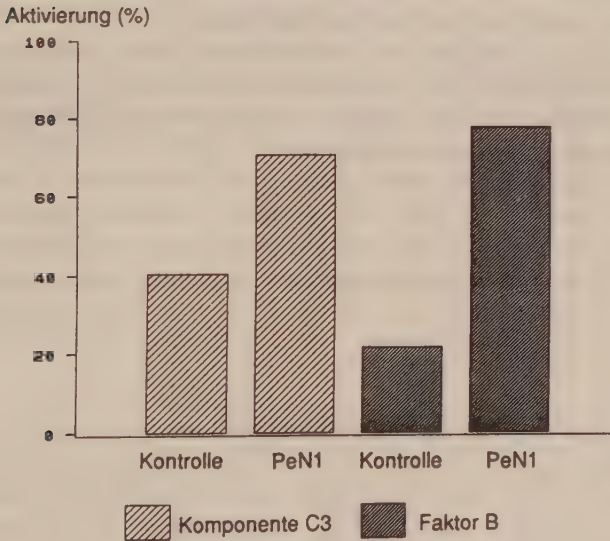


Abb. 53 : Aktivierende Wirkung des Glykogens PeN1 aus *Perna canaliculus* auf die C3- und Faktor B- Spaltung (Konz.: 180 µg/40 µl NHS)

7.3.2. Stimulierung der Lymphozytenproliferation durch PeN1

Im Gegensatz zu sulfatierten Polysacchariden war für neutrale Polysaccharide keine mitogene Wirkung auf Lymphozyten bekannt. Da wir eine Korrelation zwischen antikomplementärer und proliferationssteigernder Wirkung vermuteten, überprüften wir den Einfluß von Glykogenen auf die Lymphozytenaktivität in dem schon vorher erwähnten in-vitro-Testsystem (C.3.7.3.).

Wie aus Abb. 54 ersichtlich ist, erreichten wir mit dem Glykogen PeN1 in einer Konzentration von 100 µg/ml eine maximale Stimulierung von ca. 120 %. Die mitogene Wirkung verringerte sich mit abnehmender Konzentration und erreichte unterhalb einer Konzentration von 1 µg/ml die Kontrollwerte.

Der Kurvenverlauf des Glykogens der Miesmuschel war ähnlich, jedoch erreichte die maximale Stimulierungsrate bei der höchsten Konzentration nur die Hälfte des Perna-Glykogenwertes. Ein in demselben Testsystem eingesetztes Glykogen der Auster wies keinerlei Lymphozytenaktivität auf.

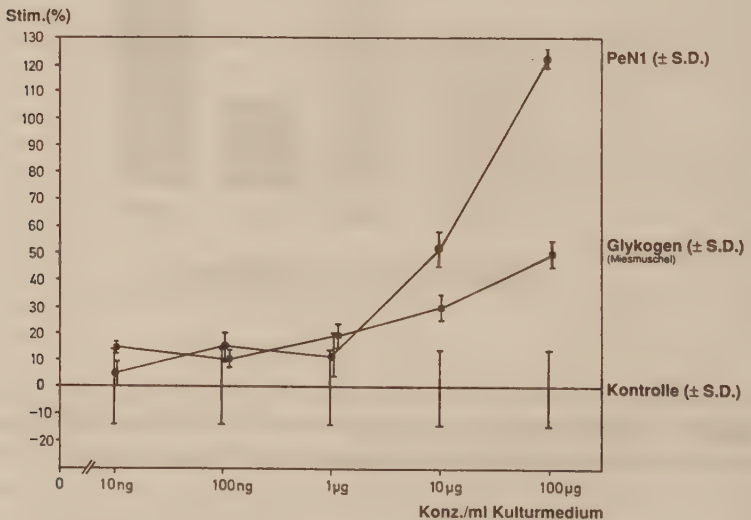


Abb. 54 : Stimulierung der Lymphozytenproliferation mit dem Glykogen PeN1 im Vergleich mit anderen Glykogenen

Bei in-vitro-Testungen nach Vorstimulierung der Lymphozyten mit Phythämagglutinin oder Concanavalin A konnte für alle drei Glykogene lediglich eine Stimulierung von 20-35 % bei Konzentrationen von 10-100 µg/ml nachgewiesen werden. Damit zeigen (1→4)-α-D-Glucane ein stark abweichendes Stimulierungsverhalten im Vergleich zu sulfatierten Polysacchariden. Im internen Vergleich könnte die unterschiedliche Aktivität der verschiedenen Glykogene gegenüber Lymphozyten auf differierende Molekulargewichte oder höheren Verzweigungsgrad zurückgeführt werden.

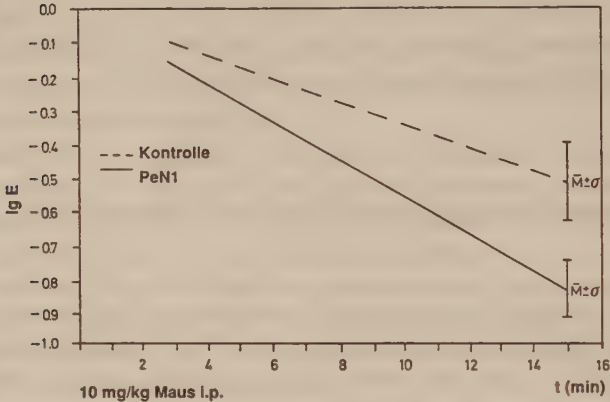
7.3.3. Phagozytoseaktivität des Glykogens PeN1 im Carbon - Clearance - Test

Um abzuklären, ob das aus *Perna canaliculus* isolierte Glykogen PeN1 noch andere immunstimulierende Eigenschaften besitzt, wurde seine Rolle im phagozytären System untersucht. Obwohl in in-vitro-Testsystemen wie dem Granulozytentest (BRANDT 1967) und der Biolumineszenz (ALLEN 1981) keine erhöhte Phagozytoserate durch dieses Glykogen festgestellt werden konnte, stieg die Phagozytoseaktivität von Makrophagen im Carbon-Clearance-Test signifikant an. Diese Diskrepanz könnte damit erklärt werden, daß die Makrophagenphagozytose durch T-Lymphozyten-induktion stimuliert wurde.

Mit Hilfe dieses in-vivo-Testes kann die Fähigkeit von Mäusemakrophagen bestimmt werden, intravenös injizierte, gelatine-stabilisierte Kohlepartikel zu entfernen. Die Elimination der Kohlepartikel wird spektrophotometrisch in einem gewissen Zeitraum verfolgt. Die Steigung der aus diesen Daten gewonnenen Geraden ($\lg E/t$) wird als Regressionskoeffizient bezeichnet. Zur Ermittlung der Phagozytoserate wird das Verhältnis der Regressionskoeffizienten (RC_t/RC_c) einer mit Substanz behandelten Testgruppe und einer unbehandelten Kontrollgruppe gebildet. Ist RC_t/RC_c unterhalb 1,5, so handelt es sich um eine schwache Wirkung; oberhalb von 1,5 kann die Wirkung als gut beurteilt werden, wobei bei gleicher Applikationsart strukturell ähnliche Substanzen als Referenz herangezogen werden.

Unter diesen Bedingungen erreichte das Glykogen PeN1 eine signifikante Steigerung der Phagozytoserate (Abb. 55). Mit einem Wert von 1,6 kann im Vergleich mit anderen Polysacchariden von einer guten Stimulierung der Makrophagen gesprochen werden.

Abb. 55 : Carbon - Clearance - Test des Glykogens PeN1
Verlauf der Kohleelimination (—) im Vergleich zur Kontrolle (---)



Tab. 33 : Carbon - Clearance - Regressionskoeffizienten

RC_{tr}	RC_c	RC_{tr}/RC_c
$0,056 \pm 0,006$	$0,035 \pm 0,008$	1,6

7.3.4. Hemmung des Rattenpfotenödems durch PeN1

Von einer Reihe von Polysacchariden, darunter auch Glucanen, wird von einer entzündungshemmenden Aktivität in Tiermodellen berichtet. Neben einigen sulfatierten und proteinhaltigen Polysacchariden (ROCHE E SILVA *et al.* 1969, ARITA *et al.* 1974, WAGNER *et al.* 1981) erwiesen sich auch glucuronsäurehaltige Heteropolysaccharide (KIHO *et al.* 1985) und teils veresterte (1→3)- α -D-Mannane (UKAI *et al.* 1983) als wirksam. Eine saures Arabinogalaktan aus den Früchten von *Sabal serrulata* wirkte in mehreren Tiermodellen stark antiödematös (WAGNER *et al.* 1981).

Unter den Glucanen bewirkte ein (1→6) verzweigtes (1→3)- β -D-Glucan aus Fruchtkörpern von *Dictyophora* in einer Konzentration von 25 mg/kg (2 x i.p.) eine 39 %ige Reduktion des Ödemvolumens im Carrageenan-Rattenpfotenmodell (HARA *et al.* 1982).

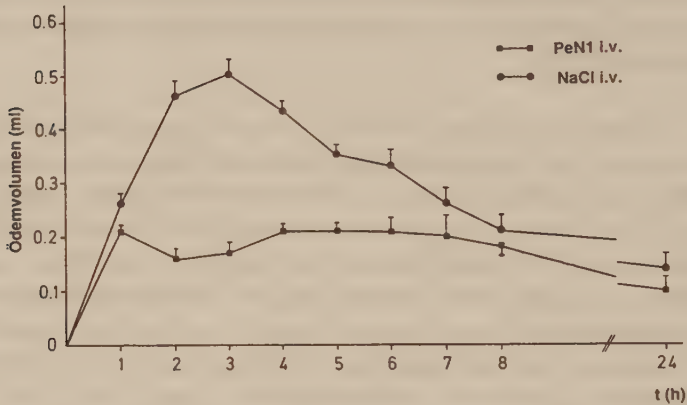
Das Carrageenan-induzierte Rattenpfotenödem stellt das am weitesten verbreitete Entzündungsmodell für die Suche nach entzündungshemmenden Stoffen dar. Man kann den Verlauf der Ödembildung in die Histamin- und Serotoninphase, in die Kininphase und in die Prostaglandinphase einteilen (DI ROSA *et al.* 1971), wobei eine Reduktion des Ödemvolumens durch Cyclooxygenasehemmstoffe seit längerem bekannt ist (VINEGAR *et al.* 1987).

Während der ersten sechs Stunden der akuten Phase der Reaktion scheint jedoch das Komplementsystem die entscheidende Triggerfunktion im Entzündungsgeschehen zu übernehmen, wie in Untersuchungen an dekomplementierten Ratten nachgewiesen wurde (DI ROSA *et al.* 1971). Bei einer Reduktion des Komplementtiters des Versuchstieres durch Injektion von Antiserum, das gegen polymorphkernige Leukozyten gerichtet war, wurde sechs Stunden nach der Carrageenanprovokation eine 50 %ige Verringerung des Ödemvolumens gemessen. Eine Beteiligung der polymorphkernigen Leukozyten an der beobachteten Wirkung wurde durch Injektion von Methotrexat, einer Substanz ohne Komplementaktivität, ausgeschlossen. Nach Gabe von Methotrexat konnte keine Ödemhemmung gemessen werden, obwohl die Leukozytenzahl stark vermindert wurde.

Die bei intraperitonealer und intravenöser Applikation gemessene antiphlogistische Wirksamkeit von Polysacchariden korreliert nicht immer mit Ergebnissen nach oraler Gabe (HARA *et al.* 1982, KATO *et al.* 1985). Daher applizierten wir das Glykogen PeN1 intravenös einmal eine Stunde vor der Carrageenanprovokation in einer Konzentration von 3 mg/kg. Wir fanden für das Glykogen PeN1 mit einer Abnahme von 44 % eine starke Reduktion des Rattenpfotenödems (Tab. 34).

Dabei wurde, verglichen mit dem bekannten Entzündungshemmer Indomethacin, eine zweifach so hohe Wirkung mit einem Drittel der Dosis erzielt. Die maximale Aktivität des (1→4)- α -D-Glucans wurde in einem Zeitraum von 2 bis 6 Stunden nach der Carrageenaninjektion gemessen und lag damit in der akuten, komplementabhängigen Phase des Entzündungsgeschehens (Abb. 56).

Abb. 56 : Antiphlogistische Aktivität des Glykogens PeN1 im Carrageenan-induzierten Rattenpfotenödem



Tab. 34 : Einfluß des Glykogens PeN1 auf das Carrageenan-induzierte Rattenpfotenödem

Akute Antwort				
Substanz	Dosis mg/kg	Anzahl Tiere	Ödemvolumen ml/h $\pm$ S.D.	Ödemvolumen Reduktion (%)
NaCl 0,9 %	-	25	2,29 $\pm$ 0,12*	-
Glykogen PeN1	3	10	1,28 $\pm$ 0,13*	44,1
Indomethacin	10	13	1,38 $\pm$ 0,09*	22,9
Gesamtantwort				
NaCl 0,9 %	-	20	4,36 $\pm$ 0,32	-
Glykogen PeN1	3	5	3,18 $\pm$ 0,37	27,1
Indomethacin	10	13	3,44 $\pm$ 0,29	9,0

* p 0,05

Substanzgabe i.v. 1 h vor Carrageenan, 1. Ödemmessung 1 h nach Carrageenan.

Als möglicher Reaktionsmechanismus komplementaktiver, ödemhemmender Polysaccharide kann damit bei dem vorgestellten Modell eine Aktivierung der Komplementkaskade mit nachfolgender Erniedrigung der Anaphylatoxinspiegel (C3a, C5a) und eine Beeinflussung des über mehrere Faktoren verbundenen Kininsystems diskutiert werden.

8. Diskussion der Pernauntersuchungsergebnisse

Der Wirkmechanismus der zwei strukturell verschiedenen, immunstimulierend wirkenden Polymeren im Perna-Muschelextrakt scheint bei beiden auf einer **antikomplementären** Wirkung zu beruhen. Während das sulfatierte Glykoprotein PeL2, wie die anderen sulfatierten Polysaccharide aus unserem Screeningprogramm seine Wirkung speziell über den Klassischen Komplementweg entfaltete, beeinflusste das neutrale Glykogen PeN1 nur den Alternativen Weg. Aufgrund unserer Ergebnisse und aufgrund von Literaturdaten (BAKER *et al.* 1986) kann für die sulfathaltige Komponente ein aktivierender Mechanismus mit Angriffsorten an den Startkomponenten C1q und Faktor B vermutet werden.

Für das Glykogen konnte eine Aktivierung der Einzelkomponente C3 und des Faktors B nachgewiesen werden. Durch ein Zusammenspiel von Komplementaktivität und stimulierender Wirkung auf T-Lymphozyten und das retikuloendotheliale System könnte die antiphlogistische Wirkung dieser Polysaccharide zustande kommen.

Untersuchungen über "counter-irritant" Effekte mit sulfatierten Polysacchariden zeigten neben einem lokal entzündlichen Effekt bei subcutaner Applikation eine entgegengerichtete, entzündungshemmende Wirkung bei intravenöser Gabe (TIMSIT *et al.* 1980). Gleichzeitig wurde neben dem Anstieg oxidierend wirkender Serumglykoproteine (Haptoglobin, Ceruloplasmin) eine Erhöhung des Komplementspiegels nach i.v. Applikation dieser Substanzen nachgewiesen. Die antiphlogistische Wirkung dieser Polysaccharide könnte somit auf einer Komplementdeplettierung bei gleichzeitiger Stimulierung des phagozytären Systems beruhen.

Ähnliche Hinweise lieferten Untersuchungen von YAMASHITA und Mitarbeitern (1982), die mit einer i.p. Injektion hoher Austerglykogendosen (5 g/kg Maus) Entzündungsreaktionen erzeugen konnten, während sich gleichzeitig die CR_3 -Rezeptorendichte an der Oberfläche glykogenstimulierter Makrophagen stark erhöhte (WEIR 1984). Da wir eine antiödematöse Wirkung für niedrige Glykogendosen (3 mg/kg Ratte) gefunden haben, scheint ein duales biologisches Wirkprofil der Polysaccharide in Abhängigkeit von Dosierung und Applikationsart vorzuliegen.

Nachdem wir im Muschelextrakt aus *Perna canaliculus* auch hohe Enzymaktivitäten nachgewiesen hatten, und von einigen proteolytischen Enzymen seit längerem eine Spaltung der Immunglobulinstruktur an genau definierten Stellen bekannt ist, besteht die Möglichkeit, daß auch Enzyme an der beobachteten, antirheumatischen Wirkung beteiligt sind. So spaltet z.B. Papain die Immunglobuline IgG in zwei F_{ab} -Teile und einen F_c -Teil. Damit wird die $C\gamma_2$ Domäne, die den Bindungspunkt für die Komplementstartkomponente C1q darstellt, von den antigenbindenden V_H und V_L Domänen abgetrennt. Auf diese Weise wird ein enzymatischer Abbau von Immunkomplexen möglich, der bereits *in vitro* nachgewiesen werden konnte (STEFFEN *et al.* 1983).

In die Therapie bereits eingeführte Enzymmischungen* zeigten bei rheumatischen Erkrankungen, die mit einer Erhöhung zirkulierender Immunkomplexe einhergehen, gute Erfolge (HÖRGER 1983). Verschiedene Studien belegen auch die Resorption radioaktiv markierter Enzymgemische nach peroraler Gabe, wobei durch die Tritiummessung nicht zwischen enzymatisch wirksamen Enzymen und Spaltprodukten unterschieden werden konnte (STEFFEN *et al.* 1979a, STEFFEN *et al.* 1979b).

Der ebenfalls peroral angewendete Pernaextrakt weist zwar eine gewisse proteolytische Aktivität auf, doch wird diese von seiner glykohydrolytischen bei weitem übertroffen. Inwieweit Glykohydrolasen im entzündlichen und rheumatischen Geschehen eine Rolle spielen können, ist bisher nicht bekannt.

* Mulsal[®], Wobenzym[®], Fa. Mucos, Geretsried

Zur Frage einer oralen Wirkung von Polymeren des Pernaextraktes können Studien mit Anti-HIV wirksamen, sulfatierten Polysacchariden herangezogen werden, in denen eine Resorptionsrate von 4-40 % gefunden wurde (HÖCHST 1988). IKUZAWA und Mitarbeiter konnten außerdem die orale Aufnahme von Krestin, einem neutralen proteinhaltigen Glucan, über den Dünndarm nachweisen (IKUZAWA *et al.* 1988). Daher könnten die beschriebenen pharmakologischen Wirkungen des Pernaextraktes, soweit sie auf Polymerverbindungen beruhen, auch bei oraler Applikation erzielbar sein.

Die Analyse der hochmolekularen Zusammensetzung und die Bestimmung der enzymatischen und biologischen Aktivität mehrerer Pernaextraktchargen des Handels sprechen für starke Unterschiede der Präparate. Diese dürften in der Herkunft des biologischen Materials begründet sein.

Von den Muscheln ist ein ausgeprägter "Aufbau-Ruhe-Zyklus" bekannt. Unter anderem scheint der Glykogenmetabolismus mit der sexuellen Reproduktivität gekoppelt zu sein. Minimale Glykogenwerte der Muschel *Perna* wurden am Ende der Ruhephase (Winter) gemessen, während im Frühjahr ein starker Anstieg zu verzeichnen war (HICKMAN *et al.* 1980).

Weitere Faktoren, die die biochemische Zusammensetzung des Muschelkörpers beeinflussen, sind die Ernährungsbedingungen sowie der Temperatur- und Mineralstoffgehalt des Seewassers. Laut Firmenangaben wurden mehrfach wichtige Parameter, wie die Erntezeit der Muscheln und die Öffnungs- und Lyophilisierungstechnik, verändert. Unterschiede innerhalb der untersuchten Chargen ergaben sich auch durch die Herstellung des Extraktes aus dem Gesamtschneckenkörper oder aus den Gonaden allein.

Die biologischen in-vivo-Standardisierungsmethoden des Extraktes, die zur Zeit mit Hilfe des Rattenpfotenödems oder einer Blutungshemmung (KOSUGE 1985) durchgeführt werden, erwiesen sich in bezug auf die von uns gefundenen, antiphlogistischen Polysaccharide als nicht ausreichend. Eine konstante Zusammensetzung und biologische Aktivität des Pernaextraktes kann nach unseren Untersuchungen nur über verbesserte Standardisierungsmethoden erreicht werden.

D. Zusammenfassung

I. Der Einfluß von pflanzlichen und tierischen Naturstoffen auf das **Komplementsystem**, ein Effektorsystem der unspezifischen Immunabwehr, wurde untersucht.

I. 1. Zur Durchführung von Screeninguntersuchungen mit **hochmolekularen** und **niedermolekularen** Naturstoffen wurden **vier modifizierte in-vitro-Gesamtkomplement-Testsysteme** etabliert, deren Standardreaktionsbedingungen laufend über Komplementtitrationen (GP-NHS 1, GP-NHS 2) und Antikörpertitration überprüft wurden. Zwei Systeme (CP 1, CP 2) deckten den Klassischen Weg ab, die anderen beiden selektiv den Alternativen Weg (AP 1, AP 2). Detektion und Beurteilung der Aktivität erfolgten spektroskopisch mit Hilfe einer Reihe von Kontrollreaktionen. Trotz wechselnder Komplement- und Erythrozytenquellen konnte eine hohe Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Testmethoden erreicht werden.

Zur Klärung des detaillierteren Wirkmechanismus wurden **Molekulartitrationen** der Komponente C1, **Immunelektrophoresen** für die Komponente C3 und **Immunfixationsteste** für C3 und den Faktor B eingesetzt.

Die Relevanz der Testergebnisse für den menschlichen Organismus wurde durch die direkte Verwendung verschiedener menschlicher Seren gewährleistet. Soweit Meerschweinchenserum zum Einsatz kamen, wurde die Aktivität nochmals mit Humanseren überprüft.

Von den im Test mit Komplementkomponenten interferierenden Faktoren wurden einige Lösungsmittel (z.B. Methanol, Ethanol, DMSO in Dosisabhängigkeit), Drogenbegleitstoffe wie z.B. Chlorophyll und Gerbstoffe, hämagglutinierende oder zytotoxische Substanzen als das Versuchsergebnis verfälschend erkannt.

I. 2. Das Screening von Naturstoffen erbrachte folgende Ergebnisse :

Niedermolekulare Substanzen :

In der Stoffklasse der **Flavonoide** zeigten polyphenolische Flavonolderivate die höchste antikomplementäre Wirkung. Sie lag im Klassischen Weg bei einer Konzentration von 10^{-4} M im Bereich von 55-60 %. Zwischen dem Substituentenmuster und der Wirkung bestehen enge Beziehungen.

In der Stoffklasse der **Phenolcarbonsäureester** erhöhte sich die antikomplementäre Wirkung mit Zunahme der Anzahl von Kaffeesäureresten. Die **Dicaffeoylchinasäuren** Cynarin bzw. Isochlorogensäure reduzierten die hämolytische Reaktion des Klassischen Komplementweges in einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ M um 60 bis 95 %.

In der Stoffklasse der Flavonacylglykoside erreichte z. B. das **2'',4''-Dicumaroylstragalol** aus *Quercus ilex* die höchste Aktivität ($5 \cdot 10^{-5}$ M $\rightarrow$ 69,9 %; 10^{-5} M $\rightarrow$ 38,2 % Reduktion der Hämolyse des Klassischen Weges).

In der Reihe der bisher noch nie untersuchten **Triterpensäuren** wurden stark wirksame Verbindungen gefunden. Dabei scheint die Carboxylgruppe ein essentielles Strukturmerkmal darzustellen. Ihre Position im Grundgerüst beeinflusst sowohl Qualität wie Quantität der Wirkung. Als potenteste antikomplementäre Substanz in beiden Komplementwegen erwies sich die **Boswellinsäure**, der Hauptinhaltsstoff aus dem antiphlogistisch wirksamen Harz von *Boswellia serrata* ($5 \cdot 10^{-5}$ M : CP 1 $\rightarrow$ 85,1 %; AP 1 $\rightarrow$ 56,0 %). Auch die ubiquitär vorkommenden **Ursolsäure** und **Crataegussäure** zeigten starke Aktivität.

Hochmolekulare Substanzen :

Sulfatierte Polysaccharide aus Braunalgen bewirkten im Klassischen Weg eine 100 %ige Hemmung der Hämolyse in einer Konzentration von 0,1 mg/ml. Sie sind damit stärker wirksam als das bekannte, komplement-aktive Heparin. Ihr Einfluß auf den Alternativen Weg war deutlich schwächer. Für Fucoidan wurden Angriffspunkte an der Komponente C1q und dem Faktor B nachgewiesen. Die Ergebnisse sprechen für einen aktivierenden Mechanismus dieser Substanzklasse, womit Literaturangaben bestätigt werden konnten.

In der Reihe der **neutralen Polysaccharide** konnte als neue, antikomplementäre Wiederholungseinheit die (1→4)- α verknüpfte D-Glucose, wie sie z.B. im **Glykogen** des menschlichen Organismus vorliegt, entdeckt werden. Diese Glucane sind als selektive Aktivatoren des Alternativen Weges einzustufen. Die höchste Aktivität zeigte die **Amylose** mit 86,5 %iger Hämolysereduktion bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml. Für dieses Polysaccharid war auch eine Konversion des Faktors B um 46,5 % nachzuweisen.

Uronsäurehaltige Polysaccharide wiesen in unseren Untersuchungen starke Struktur-Wirkungsabhängigkeiten auf. Saure Arabinogalaktane aus **Viscum album** oder **Arnica montana** mit einem Gehalt von bis zu 20 % Galakturonsäure waren nur im Alternativen Weg aktiv (z.B. Amika-Polysaccharid : 0,1 mg/ml → 92,7 %). Durch dieses Polysaccharid wurden die Komponente C3 zu 60 % und der Faktor B zu 50 % aktiviert. Dagegen zeigten Polysaccharide mit Gehalten von über 50 % Uronsäuren eine Wirkung auf beide Komplementwege. Die höchste Aktivität wurde für ein die Zucker Galaktose, Rhamnose, Arabinose und Xylose enthaltendes Heteroglykan aus **Achyrocline satureioides** gefunden (0,1 mg/ml : CP 2 → 93 %; AP 2 → 69,6 %). Dieses Heteroglykan aktivierte die beiden Startkomponenten des Alternativen Weges zu 75 bzw. 65 %.

II. Aus dem Extrakt der grünlippigen Neuseelandmuschel *Perna canaliculus* (Gmelin), die empirisch bei chronischen rheumatischen Erkrankungen eingesetzt wird, konnten zwei **antikomplementäre** Polymerverbindungen angereichert und isoliert werden.

II. 1. Die erste Verbindung, ein **sulfatiertes Glykoprotein**, wurde durch eine testbegleitende Fraktionierung ("bioguided fractionation") über Ammonium-sulfatfällungen und Anionenaustauschchromatographie gewonnen. Weitere Reinigungsschritte erfolgten mit Gelfiltration und Hydrophober Interaktionschromatographie.

Das isolierte sulfatierte Glykoprotein besitzt neben einem hohen Proteinanteil (51,6 %), 18,8 % Kohlehydrate mit der Hauptkomponente Glucose und 11,0 % gebundenes Sulfat. Der Kohlehydratteil besteht aus (1→4) verknüpfter D-Glucose mit L-Fucose-Verzweigungspunkten nach jedem vierten Glucosebaustein. Der Proteinteil setzt sich aus allen wichtigen Aminosäuren zusammen, wobei die sauren Aminosäuren mengenmäßig dominieren.

Durch Gelfiltration erhielten wir ein mittleres Molekulargewicht von 280000 D.

Das isolierte Muschelglykoprotein besitzt in vitro eine hohe **Komplementaktivität**. Im Klassischen Weg führt es in einer Konzentration von 0,1 mg/ml zu einer ca. 100 %igen Reduktion der Hämolysereaktion zweier Gesamtkomplement-Testsysteme. Diese Wirkung ist dem **sulfatierten Polysaccharidteil** zuzuordnen. In Einzelkomponenten-Tests wurde auch eine Beeinflussung der Startkomponenten des Alternativen Weges nachgewiesen (66 %ige Konversion des Faktors B). Für die sulfatierten Polysaccharide ist ein komplementaktivierender Wirkmechanismus an der Startkomponente C1q und dosisabhängig an weiteren Komponenten der Kaskade anzunehmen.

Das Glykoprotein stimulierte außerdem in vitro nach Con A-Vorstimulierung die T-Lymphozytenproliferation und die Freisetzung des Tumornekrose-Faktors aus Makrophagen. Trotz des hohen Sulfatierungsgrades konnte im Vergleich zu Heparin nur eine sehr geringe antikoagulierende Wirkung gefunden werden. Daneben konnte ein schwach inhibierender Einfluß auf das Enzym Elastase nachgewiesen werden.

- II. 2. Als zweite Verbindung konnte aus Perna nach Hitzebehandlung des Extraktes und Anionenaustauschchromatographie ein **neutrales Glucan** rein gewonnen werden. Es handelt sich um ein proteinfreies **Glykogen** vom Molekulargewicht $2,58 \cdot 10^7$ D mit (1→4)- α -D-Glucoseketten, die an jeder fünften Glucose am C-6 durch Seitenketten verzweigt sind.

Das isolierte Glykogen erwies sich in vitro als **Aktivator des Alternativen Weges**. Diese Wirkung konnte sowohl in einem Gesamtkomplementsystem als auch über die Konvertierung der Komponente C3 zu 51 % und des Faktors B zu 72 % nachgewiesen werden.

Das Glykogen besitzt außerdem eine stark immunstimulierende in-vitro-Wirkung auf die Lymphozytenproliferation und eine in-vivo-Wirkung auf das phagozytäre System.

Das Polysaccharid zeigte im Rattenpfotenödem-Modell eine signifikante 44 %ige Hemmung bei einer Konzentration von 3 mg/kg, die ca. sechsmal höher liegt als jene von Indomethacin.

- II. 3. In den Pernaextrakten wurden elf aktive **Glykohydrolasen** nachgewiesen. Sie konnten auch in der Miesmuschel und Auster mit ähnlich hoher Aktivität gefunden werden. Die gemessene spezifische Proteaseaktivität aller vier Muschelextrakte war demgegenüber deutlich niedriger.

- II. 4. Untersuchungen von sechs verschiedenen Pernachargen ergaben sehr stark voneinander abweichende chemische Zusammensetzungen und große Schwankungen in der antikomplementären Wirkung. Ein rationaler therapeutischer Einsatz setzt eine verbesserte **Standardisierung** und noch durchzuführende in-vivo-Studien voraus.

E. Experimenteller Teil

1. **Herkunft der Muscheln und Testsubstanzen**

1.1 Herkunft der Muschellyophilisate

Perna canaliculus, Mytilidae :

Perna 1 : Arzneimittelspezialität " SEATONE[®]", 100 Kps. á 230 mg (ohne Zusätze), keine Chargenbezeichnung, Kaufdatum Dezember 1985, McFarlane Lab. NZ Limited, Auckland, New Zealand, Importeur Lucien Ortscheit GmbH, Saarbrücken

Perna 2 : Arzneimittelspezialität " SEATONE forte[®]", 96 Kps. á 380 mg (ohne Zusätze), keine Chargenbezeichnung, stabilisiert siehe Perna II, McFarlane Lab. NZ Limited, Auckland, New Zealand, Importeur Seviton-Naturprodukte GmbH, Hohen-Sülzen b. Worms

Perna 3, Perna 4, Perna 5 : Arzneimittelspezialitäten der Jahre 1985-1987

Perna I : lyophilisiertes Pulver, Ernte Hauraki Golf nahe Auckland, Neuseeland; Batch 5392 (NZ), Erntedatum 1984/85, von Hand geöffnete Muscheln

Perna II : lyophilisiertes Pulver, Batch 8713 (AUS), Erntedatum Februar 1987, stabilisiert (KOSUGE *et al.* 1985), mit Vakuum geöffnete Muscheln

Mytilus edulis, Mytilidae :

lebende Miesmuscheln aus Frankreich, Fa. Moby-Dick, München (Miesmuschel)

Crassostrea angulata, Ostreidae

lebende Austern aus Frankreich, Fa. Moby-Dick, München (Auster)

Herstellung der Lyophilisate aus Miesmuschel und Auster

Lebende Muscheln wurden mit einem Messer von Hand geöffnet, der Weichkörper aus den Schalen entfernt, sofort tiefgefroren und lyophilisiert. Die getrockneten Muschelkörper wurden in einem gekühlten Mahlwerk bis zu einer feinen, homogenen Konsistenz zerkleinert. Aus ca. 70 Muscheln wurden 50 g Lyophilisat erhalten.

1.2. Herkunft der Testsubstanzen

Flavonoide :

aus der Institutssammlung außer

2",4"-Di-trans-cumaroyl-astragalin, 3"-6"-Di-acetyl-2",4"-di-trans-cumaroyl-astragalin : Dr. A. Tubaro, Pharmakologisches und Pharmakognostisches Institut der Universität Triest, Triest (Italien)

Phenolcarbonsäuren :

aus der Institutssammlung außer

Isochlorogensäure, Rosmarinsäure : Fa. Roth, Karlsruhe

Triterpene und Triterpensäuren :

β -Amyrin, Friedelin, Oleanolsäure, Quillajasäure aus der Institutssammlung

Crataegussäure, Ursolsäure, 18 β -Glycyrrhetinsäure : Fa. Roth, Karlsruhe

Cucurbitacin I, β -Boswellinsäure : Dr. R. Bauer, Institut für Pharm. Biologie der Universität München, München

Quercilicosidgenin : Dr. A. Tubaro, Universität Triest, Triest (Italien)

Polysaccharide :

Sulfatierte Polysaccharide :

Dextransulfat Na-salz MG 5000 D, λ -Carrageenan Typ IV, Chondroitinsulfat Typ C, Fucoidan, Laminarin (LAM 2) : Fa. Sigma, München

Heparin Na-salz (USP XXI), Laminarin (LAM 1) : Fa. Roth, Karlsruhe

Neutrale Polysaccharide :

Glykogen Typ XI (Oyster), Glykogen Typ VII (*Mytilus edulis*), Glykogen Typ X (Rabbit liver), Amylose Typ III (Potato) : Fa. Sigma, Taufkirchen

Xylogalaktoglucan (aus der Zellkultur von *Arnica montana*, A I) : J. Puhlmann, Institut für Pharm. Biologie der Universität München, München

Uronsäurehaltige Polysaccharide :

hochgereinigte, saure Fraktion aus *Arnicae herba* (Ahb.Fraktion), Pektin (aus *Arnicae herba*, Ahb. 1), saures Arabinogalaktan (aus der Zellkultur

von Arnica montana, A II), saure Heteroglykane (aus Achyrocline herba, AS 3, AS 4) : J. Puhmann, Institut für Pharm. Biologie der Universität München, München

Mistelpolysaccharid (aus Viscum album, Fb) : Dr. E. Jordan, Luitpold-Werk, München

2. Pharmakologische Methoden

Pharmakologische Untersuchungen in vitro

2.1. Hämolytische Testsysteme zur Bestimmung der Gesamtkomplementaktivität

2.1.1. Geräte

- Eppendorf Reaktionsgefäße 1500 µl, 2000 µl
- Eppendorf Pipetten 10 - 1000 µl
- Kottermann Wasserbad
- Hettich Kühlzentrifuge Rotanta /RP
- Beckman Kühlzentrifuge J-6B
- Shimadzu Spektrophotometer UV-120-01

2.1.2. Reagenzien

Alle Substanzen zur Pufferherstellung waren von p.A. Qualität (Fa. Merck Darmstadt, Fa. Sigma München, BRD)

Gelatine (Difco Lab., Detroit USA)

Hammelblut konserviert (φRAW 30), Kaninchenblut konserviert (φRBO 20), Ambozeptor 6000 (φRLC 24, Anti-Schaf-Erythrozyten-Serum vom Kaninchen), lyophilisiertes Meerschweinchenkomplement (φRAY 14) : Behringwerke AG, Marburg, BRD.

Hammelblut und Kaninchenblut wurden auch aus der Ohrvene frisch entnommen, mit EDTA versetzt und vor der Weiterverarbeitung 1 Tag bei 4 °C aufbewahrt.

Normales menschliches Serum (NHS) wurde von gesunden Probanden erhalten, teils gepoolt (3-5 Seren nach Titerbestimmung), teils als Einzelserum verwendet (Aufbewahrung -20 °C).

Komplementeinzelkomponenten HuC1, GPC2, GPC4 : Cordis Corp., Miami, Florida USA über Fa. Madaus, Köln, BRD

2.1.3. Klassischer Weg

2.1.3.1. Puffer

Alle Puffer wurden mit bidest., pyrogenfreiem Wasser hergestellt, autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

Konzentrierte Stammlösungen :

- ST 1 : NaCl 44,15 g, 5,5-Diethylbarbitursäure Na-salz 5,095 g, HCl 1 N 17,29 g, Aqua dest.ad 1000,0 g pH 7,3 Leitfähigkeit 64 mS
- ST 2 : Na₂EDTA 37,3 g, NaOH 2 N 50,0 g, Aqua dest.ad 500,0 g, pH 7,65 27 mS
- ST 3 : Saccharose 243,05 g, 5,5-Diethylbarbitursäure Na-salz 2,55 g, Aqua dest. ad 500,0 g, pH 7,3 , unter Erwärmen lösen, Aufbewahrung bei -20 °C

Maßlösungen :

- M 1 : 0,3 M CaCl₂-Lösung
- M 2 : 2,0 M MgCl₂-Lösung

Gebrauchslösungen :

- K 1 : ST 1 1:5 mit Aqua dest. verdünnen, Zusatz von 0,00015 M Ca⁺⁺, 0,001 M Mg⁺⁺, 0,3 % Gelatine, pH 7,3 Ionenstärke 15,5 mS
- K 2 : ST 2 50,0 g, ST 1 80,0 g, 0,3 % Gelatine, Aqua dest. ad 500,0 g, pH 7,6 15,4 mS
- K 3 : ST 3 60,0 g, ST 1 40,0 g, 0,00015 M Ca⁺⁺, 0,001 M Mg⁺⁺, 0,3 % Gelatine, Aqua dest. ad 500,0 g, pH 7,3 6,45 mS

2.1.3.2. Gewinnung der Hammelerythrozyten (E-Zellen)

5 ml Hammelblut steril der Flasche entnehmen, zentrifugieren (480 g, 10 min 4°C), Überstand verwerfen, 3 x mit je 10 ml K 2 waschen, mit 5 ml K 1 10 min bei 37°C inkubieren, zentrifugieren, 1 x mit K 2 , 2 x mit K 1 (je 10 ml) waschen, in ca. 20 ml K 1 suspendieren, auf eine Zellzahl von $1,18 \cdot 10^9$ E/ml einstellen. Die E-Zellen sind bei Lagerung bei 4°C höchstens 2 Tage haltbar.

2.1.3.3. Gewinnung der sensibilisierten Hammelerythrozyten (EA-Zellen)

10 ml E - Zellsuspension ($1 \cdot 10^9$ E/ml) langsam unter Schwenken mit 10 ml optimaler Ambozeptorverdünnung in K 2 (ca. 80 μ l Ambozeptor 6000) mischen, 20 min bei 37°C inkubieren, zentrifugieren (s.o.), mit je 10 ml K 2, K 1 und 3 x K 3 waschen, in ca. 10 ml K 3 suspendieren, auf eine Zellzahl von $1,18 \cdot 10^9$ EA/ml einstellen. Die EA -Zellen sind bei Lagerung bei 4°C höchstens 4 Tage haltbar.

2.1.3.4. Standardisierung , Einstellung der Erythrozytenzahl

100 μ l der E - oder EA - Zellsuspension in K 1 wurden in 20,0 ml eiskaltes Aqua dest. pipettiert und gut gemischt. Die Absorption der Lösung wurde bei 412 nm gemessen. Die Zellsuspension wurde gleichzeitig mit einer Neubauer Zählkammer ca. sechsmal ausgezählt. Dazu wurden die Zellen mit Hayem'scher Lösung so verdünnt (1:25 bis 1:100), daß ca. 200 Zellen in 5 Kleinquadraten vorhanden sind. Aus mehreren Wertepaaren wurde eine Hämoglobin-Zellzahl Eichgerade aufgestellt. Bei zu hoher Zellzahl wurde die Erythrozytensuspension nach folgender Formel verdünnt :

$$V_{\text{End}} = V_{\text{Anfang}} \cdot \frac{E_{\text{gemessen}}}{E_{\text{gefordert}}}$$

Die Differenz $V_{\text{End}} - V_{\text{Anfang}}$ ergab die fehlende Menge Puffer. Nach Zugabe der errechneten Menge Puffer wurde die Extinktion nochmals überprüft.

In unserem System galt : Extinktion 0,380 entsprach einer EA-Zellzahl von $1 \cdot 10^9$ Z/ml

2.1.3.5. Antikörpertitration

Nicht sensibilisierte Hammelerythrozyten (E-Zellen) mit einer Zellzahl von $1,2-1,4 \cdot 10^9$ Z/ml wurden im Verhältnis 1:1 mit Ambozeptorverdünnungen in K 1 (1:50 - 1:10000) 20 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach der Sensibilisierung wurde die Reaktion im Eisbad abgestoppt und mit eiskaltem K 1 1:10 verdünnt. Für die hämolytische Reaktion wurden zu 625 μ l K 1, dann 125 μ l GP-Verdünnung 1:50 in K 1 und 125 μ l unter-

schiedlich sensibilisierte EA-Zellverdünnung in je 3 Ansätzen 60 min bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte im Eiswasserbad, danach 10 min zentrifugieren bei 480 g, 4°C und Extinktionsmessung der Überstände bei 412 nm. Von dem Extinktionsmittelwert der 3 Bestimmungen wurde der E-Wert der verschiedenen AK-Verdünnungen abgezogen. Die optimale AK-Verdünnung wurde aus der graphischen Darstellung abgelesen. Sie betrug in allen Klassischen Testsystemen 1:125. Überschüssiger Antikörper wurde durch mehrere Waschvorgänge entfernt.

2.1.3.6. Komplementtitration GP 1 / NHS 1

Zuerst wurde eine Komplementverdünnungsreihe mit je 7 ml Endvolumen in K 1 hergestellt (Doppelwertbestimmung zu je 3 Zeitpunkten). Wie sich in allen unseren Untersuchungen bestätigte, sollte die Verdünnungsreihe bei lyophilisiertem GP-Serum von 1:700 bis 1:1100 reichen, bei NHS von 1:150 bis 1:400. Für den Inkubationsansatz wurden 200 µl K 1 vorgelegt, 1000 µl Komplementverdünnung und 100 µl EA-Zellen ($2,5 - 2,7 \cdot 10^8$ Z/ml) hinzupipettiert und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Ansätze wurden nach z.B. 35 min, 40 min und 45 min im Eisbad abgestoppt; nach Zentrifugieren (480 g, 4°C, 5 min) wurde die Extinktion der Überstände gemessen. Als Kontrollwert diente der E-Wert der Komplementverdünnungen, der von der gemessenen Hämolyse subtrahiert wurde. Die Ermittlung der optimalen Komplementverdünnung in diesem Testsystem erfolgte graphisch.

2.1.3.7. Komplementtitration GP 2 / NHS 2

Als Grundverdünnung dienten 10 ml der in E.2.1.3.6. ermittelten optimalen Komplementverdünnung in K 1 (GP 1:700 bis 1:800, NHS 1:300 bis 1:400). Es wurden in Parallelansätzen folgende Mengen dieser Verdünnung pipettiert : 300 µl, 350 µl, 400 µl, 450 µl, 500 µl, 550 µl, 600 µl, 650 µl, 700 µl und mit K 1 auf 1000 µl ergänzt. Nachdem 170 µl EA-Zellen ($6,5 \cdot 10^7$ Z/ml) hinzugefügt worden waren, wurde 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert, im Eisbad abgestoppt, zentrifugiert (480 g, 4°C, 5 min) und spektrophotometrisch bei 412 nm ausgewertet. Den Bezugswert stellte die Totalhämolyse der EA-Zellen (F-Wert) unter Versuchsbedingungen dar. Die Auswertung erfolgte graphisch unter Zugrundelegung der von Krogh-Gleichung.

2.1.3.8. Testsystem CP 1

Reaktionsbedingungen :

Hammel-EA $2,5 \cdot 10^8$ Z/ml, Reaktionsvolumen 1300 μ l, Puffer K 1 (0,00015 M Ca^{++} , 0,001 M Mg^{++}), pH 7,3, Komplementquelle GP / NHS, optimaler Titer, keine Vorinkubation

Tab. I

2.1.3.9. Testsystem CP 2

Reaktionsbedingungen :

Hammel-EA $2,5 \cdot 10^8$ Z/ml, Reaktionsvolumen 1625 μ l, Puffer K 1 wie bei CP 1, Komplementquelle NHS, optimaler Titer, Vorinkubation 30 min 37°C

Tab. II

Pipettierschema CP 2

Pipettiere	PK-Wert	Substanz	D-Wert	Kontrollwerte F-Wert	NK-Subst.	E-Wert _{Subst.}	E-Wert _{NHS}
I							
Puffer K 1	100 µl	50 µl	-	-	100 µl	100 µl	100 µl
Substanz in K 1 gelöst	-	50 µl	-	-	50 µl	50 µl	-
NHS konz.	50 µl	50 µl	-	-	-	-	50 µl
Vorinkubation 30 min 37°C / Abstoppen in Eiswasser 5 min							
II							
Puffer K 1	1484 µl	1484 µl	1500 µl	-	1484 µl	1609 µl	1609 µl
Vorinkubations- ansatz	16 µl	16 µl	-	-	16 µl	16 µl	16 µl
Aqua dest.	-	-	-	1500 µl	-	-	-
III							
EA-Zellen ($2,5 \cdot 10^5$ Z/ml in K 1)	125 µl	125 µl	125 µl	125 µl	125 µl	-	-
Inkubation 25-35 min je nach Testverlauf / Abstoppen mit Eiswasser / Zentrifuge 480g, 4°C, 5 min / Überstände bei 412 nm messen Die Menge des Vorinkubationsansatzes variiert je nach NHS-Titer zwischen 15-17 µl							

2.1.4. Alternativer Weg

2.1.4.1. Puffer

siehe E.2.1.3.1.

Konzentrierte Stammlösungen :

- AST 1 : 0.05 M Mg^{++} , EGTA 7,61 g, NaOH fest 1,8 g, Aqua dest. ad 100,0 g, pH 7,4 21,4 mS

Gebrauchslösungen:

- A 1 : ST 1 100,0 g, 0,3 % Gelatine, Aqua dest. ad 500,0 g, pH 7,4 15,6 mS
- A 2 : AST 1 40,0 g, ST 1 200,0 g, 0,3 % Gelatine, Aqua dest. ad 1000,0 g, pH 7,4 16,1 mS
- A 3 : ST 3 60,0 g, ST 1 40,0 g, 0,3 % Gelatine, Aqua dest. ad 500,0 g, pH 7,5 6,3 mS
- A 4 : AST 1 50,0 g, ST 1 200,0 g, 0,3 % Gelatine, Aqua dest. ad 1000,0 g, pH 7,4 16,65 mS

2.1.4.2. Gewinnung von Kaninchenerythrozyten (E-Zellen)

5 ml Kaninchenblut steril entnehmen, zentrifugieren (480 g, 10 min 4°C), Überstand verwerfen, in 10 ml A 1 suspendieren, 10 min bei 37°C inkubieren, zentrifugieren, 2 x mit A 2, 1 x mit A 1 und 2 x mit A 3 (je 10 ml) waschen, in ca.10 ml A 3 suspendieren, auf eine Zellzahl von $4,6 \cdot 10^8$ E/ml einstellen. Die E-Zellen sind bei Lagerung bei 4°C höchstens 3 - 5 Tage haltbar.

2.1.4.3. Standardisierung, Einstellung der Erythrozytenzahl

siehe E.2.1.3.4.

Bei nicht sensibilisierten Kaninchenerythrozyten entsprach eine Zellzahl von $4 \cdot 10^8$ Z/ml einer Extinktion von 0,388 bei einer Wellenlänge von 412 nm.

2.1.4.4. Komplementtitration NHS

Die Ermittlung der optimalen NHS-Verdünnung verlief analog E.2.1.3.6. Es wurden NHS-Verdünnungen von 1:15 bis 1:23 in Verdünnungsteilschritten von 0,5 im Puffer A 2 hergestellt. Die eingesetzte Kaninchenerythrozyten-suspension wies eine Zellzahl von $1,0 \cdot 10^8$ Z/ml auf. Die Inkubationsdauer der Doppelansätze variierte in 10 min Schritten von 30 min bis 90 min. Versuchsanordnung und Auswertung erfolgte nach E.2.1.3.6. Kontrollwerte waren der F-Wert der eingesetzten Menge Erythrozyten und der E-Wert des NHS.

2.1.4.5. Testsystem AP 1

Reaktionsbedingungen :

Kaninchen-E $1,0 \cdot 10^8$ Z/ml, Reaktionsvolumen 1300 μ l, Puffer A 2 (2 mM Mg^{++} , 8 mM EGTA), pH 7,4, Komplementquelle NHS (1:16-1:18), mit und ohne Vorinkubation.

Pipettierschema siehe E.2.1.3.8.(Tab. I), zusätzliche Kontrollen sind E-Wert NHS, Ersatz von A 2 durch K 2 (VBS-EDTA), HA-Testung. Wegen des starken Sedimentierens alle 10 min von Hand schütteln, Inkubationsdauer variiert zwischen 45-60 min je Testverlauf.

2.1.4.6. Testsystem AP 2

Reaktionsbedingungen :

Kaninchen-E $1,0 \cdot 10^8$ Z/ml, Reaktionsvolumen 900 μ l, Puffer A 4 (2,5 mM Mg^{++} , 10 mM EGTA), pH 7,4, Komplementquelle NHS, mit Vorinkubation 30 min 37°C, Tab. III

Tab. III

Pipettierschema AP 2

Pipettiere	PK-Wert	Substanz	D-Wert	Kontrollwerte F-Wert	NK-Subst.	E-Wert _{Subst.}	E-Wert _{NHS}
I							
Puffer A 4	100 µl	50 µl	-	-	100 µl	100 µl	100 µl
Substanz in A 4 gelöst	-	50 µl	-	-	50 µl	50 µl	-
NHS konz.	50 µl	50 µl	-	-	-	-	50 µl
Vorinkubation 30 min 37°C / Abstoppen in Eiswasser 5 min							
II							
Puffer A 4	690 µl	690 µl	830 µl	-	690 µl	760 µl	760 µl
Vorinkubations- ansatz	140 µl	140 µl	-	-	140 µl	140 µl	140 µl
Aqua dest.	-	-	-	830 µl	-	-	-
III							
E-Zellen ($1 \cdot 10^8$ Z/ml in A 4)	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	-	-

Inkubation 35-45 min je nach Testverlauf / Abstoppen in Eiswasser / Zentrifuge 480g, 4°C, 5 min / Überstände messen bei 412 nm
Die Menge des Vorinkubationsansatzes variiert je nach NHS-Titer zwischen 140-160 µl

2.2. Testsysteme zur Bestimmung der Aktivität von Komplementeinzelkomponenten

2.2.1. Funktionelle Bestimmung der Komponente C1

Geräte, Reagenzien, Puffer siehe E.2.1.1., E.2.1.2., E.2.1.3.1.

Komplementkomplettierungsreagenz C-EDTA : GP-Serum 1:30 in K2

Herstellung der EAC4b-Zellen :

EA-Zellen ($1,3 \cdot 10^8$ Z/ml) + C1 in K1 ($\mu=0,065$) 1:1 bei 30°C 45 min inkubieren → EAC1-Zellen → mehrere Waschvorgänge → + C4 in K2 (enthält EDTA) 1:1 bei 30°C 10 min inkubieren → EAC4b-Zellen und freies C1.

Reaktionsbedingungen :

50 μ l Substanz in K1 mit 50 μ l C1 1:1000 bei 37°C 20 min inkubieren, 100 μ l K1 ($\mu=0,065$) und 50 μ l EAC4b ($1,3 \cdot 10^8$ Z/ml) hinzufügen, bei Raumtemperatur 10 min inkubieren. In mehreren Waschvorgängen die hinzugefügte Substanz aus der Zellsuspension entfernen, die Zellen in 200 μ l K1 aufnehmen, 100 μ l C2 1:10 in K1 hinzufügen und bei 37°C 5 min inkubieren. Nach der Zugabe von 1000 μ l C-EDTA bei 37°C weitere 20 min inkubieren. Kontrollen, Messung und Auswertung der Hämolyse erfolgten wie bei den anderen hämolytischen Testsystemen.

2.2.2. Immunelektrophorese für die Komponente C3

2.2.2.1. Geräte :

LKB Multiphor 2117

LKB Immunelektrophorese Kit Lochdurchmesser 4 mm

2.2.2.2. Reagenzien :

Agarose f.Elektrophorese Type IV Spezial high EEO (Fa. Sigma), Antiserum to Human $\beta 1C/\beta 1A(C3)$ goat (Cordis Corp., Miami, Florida USA über Fa. Madaus, Köln), Anti-serum to Human C3 (goat) Cappel über Fa.Dynatech, Denkendorf, BRD

2.2.2.3. Puffer :

Elektrophoresepuffer P 1 : 0,05 M 5,5-Diethylbarbitursäure Na-salz, 0,01 M 5,5-Diethylbarbitursäure pH 8,6 + 10 mM EDTA

Inkubationspuffer P 2 : 0,05 M 5,5-Diethylbarbitursäure Na-salz, 0,01 M 5,5-Diethylbarbitursäure pH 8,6 + 2 mM Mg^{++}

2.2.2.4. Methodik :

Inkubationsansatz : 50 µl NHS werden mit 10 µl Substanzlösung (1mg/100µl P 2) bei 37°C 30 min inkubiert, danach mit 2800 g bei 4°C 5 min zentrifugiert. Als Kontrollen dienen ein Ansatz 50 µl NHS + 10 µl P 2 und Inulin 1 mg/100 µl.

Flachbettelektrophorese :

Agarosegel 1 % super high EEO in P 1 (10 ml auf 84 x 94 mm Gel-Bond LKB)

Auftragmenge : 10 µl pro Stanzloch an der Kathodenseite

Elektrophoresebedingungen : 10 V/cm 240 min RT, Anode rechts

Immunpräzipitation : in parallele Längsrinnen wurden 100 µl Anti-C3 Cordis 1:2 oder Anti-C3 Cappel 1:32 in P 1 eingefüllt; 24 h Diffusion in feuchter Kammer bei 8°C, danach mehrfaches Pressen zwischen Filterpapier und Waschen mit 0,1 M NaCl, anschließend Trocknung des Gels.

Färbung : Trocken gel mit Coomassie Blau (Coomassie Brilliant Blue® R-250 1,0 g in einer Mischung aus 90 ml Ethanol, 20 ml Eisessig, 90 ml Aqua dest. lösen) 10 min färben, danach mit der gleichen Färbelösung ohne Farbstoff nach Sicht entfärben.

2.2.3. Immunfixation für die Komponente C3

2.2.3.1. Geräte :

Glasplatten 12,5 x 26 cm, Gießrahmen Fa. Desaga mit Schlitzformer, Whatman Filterpapier 1 und 3

LKB Multiphor 2117, LKB Biochrom 2103 Power Supply

LKB Ultroscan 2202 Laser Densitometer, Epson FX-85 Schreiber, Apple Computer II e, Software LKB

2.2.3.2. Reagenzien :

ME-Agarose (Fa. Seakem, USA), Calciumlactat, 5,5-Diethylbarbitursäure, 5,5-Diethylbarbitursäure Na-salz (Fa. Merck, Darmstadt), Anti-HuC3c (rabbit) : Behringwerke AG, Marburg BRD, Anti-HuC3c-IgG (rabbit) : Fa. Sigma, München BRD, Anti-BF (goat) : Fa. Biogentia, Lausanne Schweiz.

2.2.3.3. Puffer und Lösungen :

Pflugshauptpuffer : 5,5-Diethylbarbitursäure Na-salz 87,6 g, 5,5-Diethylbarbitursäure 13,8 g, Calciumlactat·5H₂O 5,53 g, Aqua dest. ad 10,0 l.

Substanzpuffer P 1 : PBS (150 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7,2)

Färbelösung : 0,7 % Serva Blau in der Mischung aus 1000 ml Methanol, 1000 ml Aqua dest., 100 ml Eisessig

Entfärbelösung : wie Färbelösung ohne Farbstoff

2.2.3.4. Methodik :

Inkubationsansatz : 30 μ l NHS wurden mit 10 μ l Substanzlösung (ca. 1 mg/50 μ l P1, zentrifugiert 2800 g, 5 min) bei 37°C 160 min inkubiert und im Eisbad abgestoppt. Als Kontrollen dienten ein Ansatz NHS nativ, NHS + P1 und Inulin 5 mg/100 μ l P1. Es wurden Inkubationen mit drei verschiedenen Seren durchgeführt.

Flachbettelektrophorese :

ME-Agarosegel 0,8 % in Pflugshauptpuffer 1:1 verd. mit Aqua dest. (50 ml pro Platte); 10 min bei RT, danach 15-20 min bei 4°C erkalten lassen.

Auftragemenge : 3 μ l Inkubationsansatz

Elektrophoresebedingungen : 40 V/cm 90 min 8°C, Anode rechts, mit Pflugshauptpuffer konzentriert.

Immunfixation : 1,0 ml Anti-HuC3c pro Platte mit Glasstab homogen auf Gel verteilen, 90 min Diffusion in feuchter Kammer bei RT, mehrfaches Pressen zwischen Filterpapier, 12 h in NaCl 0,9 % bei RT einlegen, Pressen und Trocknen.

Färbung : Trockenes Gel 20 min in Färbelösung, nach Sicht Entfärben, Trocknen.

Auswertung : Scannen der gefärbten Immunpräzipitate mit einem Laser Densitometer; automatische Berechnung der Peakflächen; Berechnung des konvertierten Anteils siehe B.2.7.

2.2.4. Immunfixation für Faktor B

analog E.2.2.3., mit folgenden Änderungen :

Auftragemenge : 5 μ l Inkubationsansatz in der Mitte des Gels auftragen

Immunfixation : 1,0 ml Anti-BF (1:3 verd. mit PBS) verwenden

2.3. Lymphozytentransformationstest

modifiziert nach DUTTON *et al.* 1964, WAGNER *et al.* 1988

Verwendete Zellen :

Über Ficoll-Gradienten isolierte menschliche Lymphozyten aus hepariniertem Venenblut

Methodik :

10^5 Lymphozyten wurden mit gelöster Testsubstanz (teilweise unter Zugabe von Mitogenen wie Phytohämagglutinin und Concanavalin A als Vorstimulantien) in einer Mikrotiterplatte bei 37°C unter 5 % CO₂-95 % Luft 88 Stunden inkubiert. 18 Stunden vor dem Ende der Inkubationsperiode wurde ³H-Thymidin hinzugefügt. Die Bestimmung der Lymphozytenaktivität erfolgte über die Menge des eingebauten ³H-Thymidins.

Auswertung :

Stimulation (%) = [cpm (Test) - cpm (Kontrolle)] x 100 / cpm (Kontrolle)

Es wurden fünffach Bestimmungen in drei verschiedenen Testansätzen durchgeführt.

2.4. Prüfung auf Stimulierung des Tumor-Nekrose-Faktors

nach RUFF *et al.* 1981

10^5 Makrophagen wurden mit Reihenverdünnungen der Substanz in Puffer 12 Stunden inkubiert und der Überstand zu Fibroblasten (L 929-Zellen) pipettiert. Nach Zugabe von Actinomycin D wurde nochmals 12 Stunden inkubiert und mikroskopisch ausgewertet. Die Freisetzungsrates des TNF- α wird in Units angegeben, die dem reziproken Wert derjenigen Verdünnungsstufe des Überstands entsprechen, bei der 50 % der L 929-Zellen lysieren.

2.5. Prüfung auf Beeinflussung der Leukozyten-Elastaseaktivität

modifiziert nach BARRETT 1981

Substrat : MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC 50 μ M

Humane Leukozyten-Elastase : 50 ng/ml (entspricht 2 nM bei MG 27000 D)

Puffer : 0,1 M Tris/HCl, 0,2 M NaCl, 0,05 % Triton X 100 pH 8,0

Substanzkonz.: 10-60 μ g/ μ l

Auswertung : Detektion und Aufzeichnung des Produktes 7-Amino-4-methylcumarin erfolgten kontinuierlich mit Fluorimeter und Recorder.

2.6. Prüfung auf Beeinflussung der Blutgerinnung

Bestimmung der PTT

Geräte : KCIO Coagulometer (Fa. Amelung, Lemgo), Perkin Elmer 559 Photometer

Verwendete Substanzen : Menschliches Standardplasma, Pathromtin[®], Thromborel[®] (Behringwerke, Marburg), COA-Test[®] Heparin (Fa. KabiVitrum, München), Heptest[®] (Fa. Concept, Heidelberg), Heparin aus Schweine-mucosa (Fa. Sigma, München)

Testsubstanzkonz.: 5-150 µg/ml Plasma, bei Heparin 0,1-5 µg/ml Plasma

Methodik : 0,1 ml humanes Standardplasma, in dem die Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen gelöst war, und 0,1 ml Pathromtin wurden 2 min bei 37°C inkubiert und mit 0,1 ml 25 mM Calciumchlorid versetzt. Es erfolgten 4 Bestimmungen der Gerinnungszeit mit dem Coagulometer.

Pharmakologische Untersuchungen in vivo

2.7. Carbon-Clearance-Test

nach BIOZZI *et al.* 1953

Versuchstiere : NMRI-Mäuse, weiblich, 30 - 35 g

Kollektivgröße : 6 Tiere / Substanz, 7 Tiere / 0,9 % NaCl - Kontrolle

Tuschesuspension : Tusche (Rotringwerke, Hamburg) mit 1 % Gelatine in 0,9 % NaCl auf 16 mg/ml einstellen, Teilchengröße 200-250 Å, erwärmt auf 37°C.

Methodik : einmalige Injektion der Substanz i.p. 24 h vor Testbeginn in einer Dosis von 10 mg/kg Maus. Einen Tag später i.v. Verabreichung von 0,3 ml Tuschesuspension / 30 g Körpergewicht. Nach $t = 3, 6, 9, 12, 15$ min wurden durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus 25 µl Blut entnommen (heparinisierte Einmalmikropipetten, Fa. Brand), durch Zugabe von 2 ml dest. Wasser hämolysiert und die Kohlekonzentration bei 650 nm photometrisch bestimmt. Die Aktivität der Substanz läßt sich aus dem Verhältnis der linearen Regressionskoeffizienten $RC = \lg E/t$ der behandelten Gruppen und der Kontrollgruppen ableiten.

RC_{Substanz}	1,0 - 1,2	kein Effekt
$\frac{RC_{\text{Substanz}}}{RC_{\text{Kontrolle}}} =$	1,3 - 1,5	schwache Stimulierung
$RC_{\text{Kontrolle}}$	> 1,5	starke Stimulierung

2.8. Hemmung des Rattenpfotenödems nach WINTER *et al.* 1965

Versuchstiere : männliche SPF-Wistar-Ratten 100-110 g (SAVO-Ivanovas, Kissleg), Kontrolle : 25 Tiere, Substanz : 10 Tiere

In die rechte hintere Rattenpfote wurden subcutan 0,05 ml einer 1,0 % Carrageenanlösung eine Stunde nach der intravenösen Gabe einer Polysaccharidlösung (3-10 mg/kg in NaCl 0,9 %) injiziert. Das Ödemvolumen wurde innerhalb der ersten 8 Stunden nach der Carrageenanprovokation stündlich mit einem Plethysmometer (Fa. U.Basile, Mailand) gemessen. Nach einem Zeitraum von 24 Stunden wurde eine weitere Volumenbestimmung durchgeführt. Die prozentuale Reduktion des Ödemvolumens wurde auf eine NaCl-Kontrolle (0,9 %) bezogen. Als Referenzsubstanz diente Indomethacin (10 mg/kg).

3. **Chemische und physikalische Methoden**

3.1. Allgemeine Arbeitsmethoden

3.1.1. Physikalisch - chemische Untersuchungen

3.1.1.1. ^{13}C - NMR - Spektroskopie

Kernresonanzspektrometer AM-360 (90,56 MHz), Fa. Bruker

Lösungsmittel : D_2O 99,75 %

Standard : MeOH p.a. 10 μl

Probenkonzentration : 20 mg / 500 μl D_2O

Anzahl der Scans : 11530

3.1.1.2. IR - Spektroskopie

Gerät : Beckman AccuLab - 1

KBr - Preßling : 2,5 mg Polysaccharid / 100 mg KBr

3.1.1.3. UV - Spektroskopie

Gerät : Shimadzu Spektrophotometer UV 120-01

3.1.1.4. Fluoreszenzspektroskopie

Gerät: Spex Fluorolog 211 mit 450 Watt Xenonhochdrucklampe mit den Spaltbreiten 5 mm, 5 mm, 2,5 mm, 1,25 mm.

Meßbedingungen :

Anregungswellenlänge 280 nm, Emissionsmessung im Bereich 290-390 nm, Spaltbreite 0,5 nm, Integrationszeit 1 sec, geglättet mit Savitsky Golay Algorhythmus (n=21)

Die Messung erfolgte im Acquisitionmode, um Lichtintensitätsfluktuationen der Lichtquelle auszuschalten. Die Probe wurde bei $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,6 gemessen.

3.1.1.5. Optische Drehung

Polarimeter 241, Fa. Perkin - Elmer

Küvette : 1 ml, l = 10 cm

Lösungsmittel : Aqua dest.

Messung bei 365 nm (Hg)

3.1.1.6. Analytische Ultrazentrifugation

Analytische Ultrazentrifuge Modell E, Fa. Beckman mit photoelektrischem Scanner und Multiplexer

Zelle : Doppelsektorzelle mit Filled - Epon - Mittelstücken

Temperatur : $20,0^\circ\text{C}$

Umdrehungszahlen : 12000 Upm, 14000 Upm

Substanzkonzentration : 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2,0 mg/ml in destilliertem Wasser

Wellenlänge : 272,0 nm

Die Bestimmung des apparenten Sedimentationskoeffizienten erfolgte graphisch nach ELIAS (1969) aufgrund der Gleichung :

$$S_{\text{app}} = \frac{2,303}{\omega^2} \cdot \frac{d \cdot \lg r_i}{dt}$$

ω = Winkelgeschwindigkeit

r_i = innerer Radius von der Drehachse bis zur Mitte der Sedimentationsbande

3.1.1.7. Laser - Light - Scattering

Geräte :

Autosizer II c mit 64 Kanal-Korrelator und Autosizer Software, Fa. Malvern, Malvern England

5 mW Helium Neon Laserlampe

Olivetti Computer M 24, Fa. Olivetti, Ivrea, Italien

Oki Microline 192 Drucker, Fa. Okidata, Düsseldorf

Meßwinkel 90°, Blendeneinstellung 100 → ca. 50000-100000 counts/sec

Küvettemperaturierung : $20^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$

Meßlösung : 0,5-2,5 mg/ml in membranfiltriertem Aqua dest.

Auswertung : 2 x 10 Läufe

3.1.1.8. Gaschromatographie :

Geräte : Perkin - Elmer 900 (für gepackte Säulen)

Trärgas : Argon

Detektor : FID

Temperatur : Detektor, Einspritzblock : 250°C

Programm für die Trennung von Alditolacetaten (quantitative Neutralzuckerbestimmung) (siehe E.3.1.5.)

Säule : Glas, 6 ft x 2 mm

GP 3 % SP-2330 auf 100/200 Supelcoport

Temperatur-

programm : isotherm 200°C 2 min, danach $200-250^{\circ}\text{C}$ bei $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$

Einspritzmenge : 2-4 μl (DCM)

Programm für die Trennung partiell methylierter Alditolacetate (siehe E.3.2.13.)

Säule : OV 225, 25 m, 0,23 mm ID, Chrompack 14024-Kapillarsäule

Temperatur : 210°C isotherm

3.1.1.9. Gaschromatographie - Massenspektrometrie

Gaschromatographie :

Gerät : Hewlett Packard 5840 A
 Trägergas : Helium, 0,7 ml/min
 Detektor : Inj. 220°C / Interf. 210°C
 Temperatur-
 programm : 3 min 150°C, danach 5°C/min auf 210°C
 Säule : OV 225 , 25 m, 0,23 mm ID, Chrompack 14024-
 Kapillarsäule (für methylierte Alditolacetate siehe
 E.3.2.13.)

Massenspektrometrie :

Gerät : Hewlett Packard 5985 A
 Ionisierungsenergie : 70 eV
 GC - Split : CP = 0,7

3.1.2. Chromatographische Methoden

3.1.2.1. Dünnschichtchromatographie

Adsorbentien :

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm
 (Fa. Merck)

Laufmittelsystem für Neutralzucker :

Chloroform - Methanol - Wasser (64 : 50 : 10)

Detektion :

Anilindiphenylaminophosphorsäure :

Anilin 2 ml

Diphenylamin 2 g

Phosphorsäure 85 % 10 ml

Methanol ad 100 ml

Trockenschrank 10 min bei 120°C

3.1.2.2. Säulenchromatographie

Alle chromatographischen Verfahren wurden bei 5 - 7°C durchgeführt.

- Pumpe :** Mikroperpex Pumpe, LKB 2132
kalibriertes Volumen 1 ml
Schlauchdurchmesser 1,3 mm
Förderstrom 1-90 ml/h
- Detektoren :** Paralleldetektion mit
- Differential Refraktometer R 403, Waters Ass. Inc. und
- Uvicord S II LKB 2238, UV-Filter 206 nm, 226 nm
- Gelmaterialien :** Sephacryl[®] S-300 superfine, (Fa. Pharmacia), eff. Trennbereich : MG 10^4 - 10^6
Sephacryl[®] S-400, (Fa. Sigma), eff. Trennbereich : 10^4 - $5 \cdot 10^6$
Sephacryl[®] S-500, (Fa. Pharmacia), eff. Trennbereich : $7 \cdot 10^4$ - $2 \cdot 10^7$
Fractogel[®] HW 55, 65 (Fa. Merck)
DEAE Sepharose[®] CL-6B (Fa. Pharmacia)
Q Sepharose[®] Fast Flow (Fa. Pharmacia)
Phenyl-Sepharose[®] CL-4B (Fa. Pharmacia)
Phenyl-Fractogel HW 65 S (FAHN 1988)
- Säulen :** analytisch : ϕ 16 mm, h = 900 mm, Totalvolumen : 180 ml
 ϕ 16 mm, h = 100 mm, Totalvolumen : 20 ml
präparativ : ϕ 26 mm, h = 300 mm, Totalvolumen : 160 ml

3.1.2.3. Ionenchromatographie

- Dionex Ionenchromatograph System 14, Fa. Dionex, Weiterstadt
Vorsäule : HPIC AG 3, Fa. Dionex
Anionentrennsäule : HPIC AS 3, Fa. Dionex
Suppressorsäule : Anion Micro Membran Suppressor, Modell AMMS-1, Fa. Dionex
Detektor : Leitfähigkeitsmeßzelle
Integrator : Shimadzu C-R1A Chromatopac
Eluent : 1,7 mM NaHCO₃ / 1,7 mM Na₂CO₃

Regenerierende Säure : 25 mM H_2SO_4

Injektionsvolumen : 50 μl

Flow : 2 ml/min

Retentionszeit SO_4^{2-} : ca. 12 min

Nachweisgrenze : 3 nmol/l

Hydrolyse und Vorbereitung der Proben :

Trifluoressigsäure (HPLC Grade), Fa. Pierce, Illinois

1 - 2 mg Substanz wurde in 5 - 10 ml Glasampullenflaschen eingewogen und in 2 ml 2 N TFA gelöst. Nach dem Verschließen der Flaschen wurden diese 120 min bei 121°C im Trockenschrank erhitzt. Die TFA wurde unter Stickstoff bei 60°C entfernt und die Probe 2 x mit 1 ml Methanol p.A. versetzt und zur Trockene begast. Der Rückstand wurde in 2,0 ml Ampuva® (pyrogenfreies, dest. Wasser) aufgenommen. Die Lösung wurde durch zwei miteinander verbundene Sep-Pak® C_{18} Kartuschen (Fa. Waters Ass. Inc.) direkt in einen 5,0 ml Meßkolben filtriert. Vor der Injektion in den Ionenchromatographen wurde die Lösung nochmals durch einen Filter 0,45 μm gegeben.

3.1.2.4. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Apparative Daten : Liquid Chromatograph HP 1090 mit HP 1040 A Photodiodenarray - Detektor, kombiniert mit HP 85 B Tischcomputer, HP 9121 Diskettenlaufwerk und HP 7470 A Plotter (Fa. Hewlett-Packard, Waldbronn)

Stationäre Phase : Hibar 125-4 (Fa. Merck) Li Chrosper 100 Ch-1812 (5 μm)

Durchfluß : 1 ml/min

Mobile Phase : A: Aqua dest.

B: Acetonitril (ChromAr-Qualität, Fa. Promochem, Wesel)

Beide unter Zusatz von 1 % 0,1 N H_3PO_4

Gradient : 50 % B in 20 min auf 90 % B (linearer Anstieg), dann 10 min isokratisch mit 90 % B

UV - Detektion bei 200 nm

3.1.2.5. Gelpermeationschromatographie
siehe E.3.1.3.2.

3.1.3. Molekulargewichtsbestimmung

3.1.3.1. HPLC - Gelpermeationschromatographie

Säulen : Vorsäule mit I-125-Proteinmaterial der Fa. Waters Ass. Inc. (l=10 cm, Fa. Bischoff)

a. Typ μ -Bondagel E-125 + E-500

Trennbereich : 2000-500000 D

b. Typ μ -Bondagel E-500 + E-1000

Trennbereich : 50000-2 Mio D

Fa. Waters Ass. Inc.

Pumpe : Gilson 303 mit Manometer 802, Fa. Gilson, Villiers le Bel

Einspritzblock : Waters Ass. Inc.

Flow : 0,5 ml/min

Einspritzmenge : 15 μ l einer 1 %igen Lösung

Detektor : Paralleldetektion mit

-Differential Refraktometer R 401, Waters Ass. Inc.

-Uvicord SD, LKB 2158, UV - Filter 206 nm

Eluens : 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 6,5

Eichläufe mit Dextranen 2 Mio, 110 T, 70 T, 40 T, 10 T (Fa. Pharmacia), Glucose

Eichläufe mit Myoglobin (equine) 17800 D, Chymotrypsinogen A (bov.pancreas) 25000 D, Ovalbumin (egg) 45000 D, Serumalbumin (bovine) 67000 D, Fa. Serva

$$\text{Auswertung : } K_D\text{-Wert} = \frac{(V_E - V_O)}{(V_T - V_O)}$$

V_O = Ausschlußvolumen (Dextran 2 Mio)

V_T = Totalvolumen (Glucose)

Im linearen Trennbereich des verwendeten Gelmaterials ist der -lg M (mittleres Molekulargewicht) dem K_D -Wert direkt proportional. Die Berechnung des Molekulargewichts erfolgte nach der graphischen Ermittlung des -lg M aus dem Elutionsvolumen der Substanz V_E .

3.1.3.2. Gelfiltration

Säule : $A = 0,6 \text{ cm}^2$, $l = 90 \text{ cm}$

Säulenmaterial: Sephacryl® S-400 (Fa. Sigma)

Pumpe : Mikroperpex Pumpe LKB 2132

Flow : 10 ml/h

Detektion : Paralleldetektion mit

-Differential Refraktometer R 403 Waters Ass. Inc.

-Uvicord S II LKB 2238, UV - Filter 226 nm

Temperatur : 8°C

Eichung : Dextrane 2 Mio (Fa. Pharmacia), Glucose

DNP-Alanin MG 255, Cytochrom C 12300 D, Aldolase

(rabbit) 160000 D, Ferritin 450000 D (Fa. Serva)

Auftragmenge : 2-3 mg in 2 ml Puffer

Eluent : 0,05 M Glycin/Natronlauge Puffer pH 10,0

Auswertung : graphisch aus dem K_D -Wert analog E.3.1.3.1.

3.1.4. Proteinbestimmung

Nach LOWRY (1951)

Reagenzien : alkalisches Kupferreagenz

1 ml 2% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$

1 ml 2% K, Na-tartrat

20 ml 10% Na_2CO_3 in 0,5 N NaOH

Folin - Ciocalteus - Phenolreagenz

(Fa. Merck)

1 : 10 mit Aqua dest. verdünnen

Standard : Rinderserumalbumin (Fa. Merck) in Konzentrationen von 10-200 μg Protein/ml

Proben mit ca. 10-200 μg Protein wurden in 1,0 ml Aqua dest. gelöst und 1,0 ml alkalisches Kupferreagenz zugefügt. Nach 15 min wurde 3,0 ml verdünntes Folin-Ciocalteus-Reagenz hinzupipettiert und sofort gemischt. Nach 45 min wurde die Extinktion der Lösung bei 540 nm gegen einen Aqua dest. - Blindwert gemessen und der Proteingehalt graphisch aus der Standard-Eichgerade bestimmt.

3.1.5. Neutralzuckerbestimmung

3.1.5.1. Quantifizierung des Gesamtkohlenhydratanteils mittels Anthrontest

Modifiziert nach SPIRO (1966) und HAMPP (1986)

Reagenz : 18 ml H_2SO_4 konz.

12,5 mg Anthron

250 mg Thiourea

7 ml Aqua dest.

Standard : Glucose 10 - 80 µg in Aqua dest.

Nach Erstellung einer Verdünnungsreihe 1 : 2 in Aqua dest. wurden 400 µl Probenlösung mit 2,0 ml eisgekühltem Anthronreagenz auf dem Whirlimix gemischt und für 20 min in einem Wasserbad bei 100°C erhitzt. Danach wurde die Reaktionslösung 10 min im Eisbad abgekühlt und nach weiteren 10 min RT bei 620 nm gegen einen Blindwert gemessen. Die Auswertung erfolgte graphisch mit Hilfe einer Eichgeraden.

3.1.5.2. Quantitative Bestimmung der Einzelzucker

siehe Hydrolysebedingungen E.3.2.10.

siehe Darstellung der Alditolacetate E.3.2.11.

siehe Gaschromatographie E.3.1.1.8.

3.1.6. Uronsäurebestimmung

Nach BITTER und MUIR (1962)

Standard : Galakturonsäuremonohydrat (Fa. Ega-Chemie, 24 h über P_2O_5 getrocknet) in Konzentrationen von 4-40 µg Uronsäure/ml borsäuregesättigtes Aqua dest.

3.1.7. Aminosuckerbestimmung

Nach CHAPLIN *et al.* (1986)

Reagenzien : A. 1,0 ml Acetylaceton (2,4-Pentandion, Fa. Sigma) mit 50,0 ml 0,5 M wässriger Natriumcarbonatlösung jeweils frisch mischen

B. 0,8 g p-Dimethylbenzaldehyd in einer Mischung aus 30 ml absolutem Ethanol und 30 ml konzentrierter

Salzsäure lösen

Standard : Glucosaminhydrochlorid (Fa. Sigma) in Konzentrationen von 5-50 µg/ml Aqua dest.

Hydrolyse : Ca. 1,0 mg Substanz wurde in Glasampullen eingewogen und in 2,0 ml 2 N TFA gelöst. Nach dem Verschließen der Ampullen wurden diese 4 h bei 120°C im Trockenschrank erhitzt. Daraufhin wurde die Reaktionslösung quantitativ in einen 25 ml Spitzkolben überführt, zur Trockene einrotiert und 2 x mit Methanol p.a. versetzt, um die TFA vollständig zu entfernen. Der Rückstand wurde in Aqua dest. gelöst, so daß 5-50 µg Uronsäure/250 µl zum Einsatz kamen.

250 µl hydrolysierte, wässrige Substanzlösung wurden mit 100 µl Aqua dest. und 250 µl Reagenz A gemischt und 20 min in einem Wasserbad bei 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 1,55 ml absoluter Ethanol und 250 µl Reagenz B zugegeben und auf dem Whirlimix geschüttelt. Daraufhin wurde weitere 10 min im Wasserbad bei 65°C erhitzt und die Extinktion der erkalteten Lösungen bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen. Die Ermittlung der Aminoszuckerkonzentration erfolgte graphisch aus der Standard-Eichgeraden.

3.1.1.8. Schmelzpunkt

Kofler - Heizbank der Fa. Reichert, Wien

Der Schmelzpunkt ist unkorrigiert.

3.1.1.9. Dialyse

Dialyseschläuche :

Visking -, Servapor - Dialysierschlauch, Fa. Serva, Heidelberg

mittlerer Porenradius : 24 Å

Die Dialyse erfolgte gegen demineralisiertes Wasser.

3.2. Spezielle Arbeitsmethoden

3.2.1. Extraktion hochmolekularer Inhaltsstoffe aus Pernaextrakt

Entfernung der Lipide :

100 g Trockenextrakt von *Perna canaliculus* (Perna 1) wurden in kaltem Aceton (- 25°C) 30 min am Magnetrührer unter Eiskühlung gerührt. Die unlöslichen Bestandteile wurden abfiltriert und bei Raumtemperatur getrocknet.

löslicher Lipidanteil ca. 6 %

50 g lipidfreies Pulver wurden in 1000 ml 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 unter Zusatz von 0,15 M NaCl suspendiert und 24 Stunden bei 8°C am Magnetrührer gerührt. Durch Zentrifugation (8000 g, 60 min, 8°C) wurde der Niederschlag abgetrennt. Der Überstand wurde nach E.3.2.2. weiterverarbeitet.

3.2.2. Ammoniumsulfatfällungen (PeAF1, PeAF2)

Der Überstand (E.3.2.1.) wurde mit 472 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70 % Sättigung / 1000 ml) portionsweise versetzt und am Magnetrührer bei 8°C 12 Stunden gerührt. Die 70 % Fällung wurde abzentrifugiert (8000 g, 60 min, 8°C) und der Überstand für die 100 % Fällung verwendet. Zur vollständigen Sättigung wurden 237 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ benötigt. Das dabei verwendete Verfahren entsprach der 70 % Fällung. Beide Präzipitate wurden in destilliertem Wasser aufgenommen, 36 Stunden gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

3.2.3. Isolierung des Glykoproteins durch Anionenaustauschchromatographie (PeL2)

Säule : DEAE-Sepharose®CL 6B, Totalvolumen 160 ml

Puffersystem : 0,02 M Natriumphosphatpuffer pH 6,0

Eluent :

1. linearer Gradient 0-1 M NaCl in 0,02 M Natriumphosphatpuffer pH 6,0 (250 ml H_2O / 250 ml Puffer)
2. 3 M NaCl in 0,05 M Glycin / Natronlauge - Puffer pH 9,0

3. 0,5 N NaOH

Auftragmenge : 3 x 150 mg PeAF1 in je 30,0 ml Puffer bei 4°C 20 min gerührt, dann zentrifugiert (2800 g, 10 min, 4°C)

Flow : 30 ml/h

Fraktionierungsvolumen : 10 ml

Detektion : Refraktometer, UV 226 nm, Polarimeter

Die Chromatographie wurde bei 4-6°C durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen wurden 36 Stunden gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

3.2.4. Reinigung des Glykoproteins durch Gelfiltration (PeL2)

Eine Auftrennung des Glykoproteins wurde mit folgenden Säulen- und Puffer-Kombinationen durchgeführt :

Sephacryl® S-400 : 0,02 M Natriumphosphatpuffer + 0,15 M NaCl pH 7,0

Sephacryl® S-300 : 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 8,0

Fractogel® HW 55, HW 65 : 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 8,0

Sephacryl® S-400 : 0,2 M Glycin/Natronlauge Puffer pH 8,5

Sephacryl® S-300 : 0,1 M Glycin/Natronlauge Puffer pH 8,5

Sephacryl® S-300 : 0,02 M Glycin/Natronlauge Puffer pH 9,0

Mit folgendem System wurde eine Auftrennung erreicht :

Säule : Sephacryl® S-400, Totalvolumen 180 ml

Puffersystem : 0,05 M Glycin/Natronlauge Puffer pH 10,0

Auftragmenge : 2,0 mg PeL2 in 3,0 ml Puffer, insgesamt 5 Läufe

Flow : 10 ml/h

Fraktionierungsvolumen : 3,3 ml

Detektion : Refraktometer, UV 226 nm, Polarimeter

Die Chromatographien wurden bei 4-6°C durchgeführt. Die erhaltenen zwei Fraktionen wurden 36 Stunden gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

3.2.5. Hydrophobe Interaktionschromatographie des Glykoproteins (PeL2)

Säule : Phenyl-Sepharose® CL-4B, Totalvolumen 10 ml im Vorversuch

Phenyl-Fractogel® HW 65 S (FAHN 1988), Totalvolumen 20 ml

Puffersystem : 25 % (NH₄)₂SO₄ in 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 8,0

- Eluent : 1. 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 8,0
 2. 60 % Ethylenglykol in 0,01 M Natriumphosphatpuffer
 pH 9,5

Auftragemenge : 20 mg PeL2 wurden in 30 ml 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 8,0 gelöst, die Lösung in Portionen auf eine 25 %ige Ammoniumsalkonzentration gebracht und in drei Portionen aufgetragen.

Flow : 10 ml/h

Fraktionierungsvolumen : 2,0 ml

Detektion : UV 226 nm, Refraktometer (Pol.: +)

Die Chromatographien wurden bei 4-6°C durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen wurden 36 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

3.2.6. Isolierung saurer hochmolekularer Substanzen über Cetylpyridiniumfällungen

Das Muschelpulver wurde in 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 unter Zusatz von 0,15 M NaCl in der Kälte gerührt und abzentrifugiert (8000g, 60 min, 4°C). Zu dem Überstand wurde solange 0,15 M Cetylpyridiniumchloridlösung gegeben, bis die Präzipitation gerade begann. Nach 30 min wurde dekantiert und zentrifugiert. Der Rückstand wurde in 2-5 M NaCl gelöst, 3 x mit 96 % Ethanol präzipitiert, schließlich in Wasser aufgenommen, dialysiert und gefriergetrocknet.

3.2.7. Anionenaustauschchromatographie mit dem Batchverfahren bei erniedrigter Temperatur

Puffersysteme:

- 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 5,4 + 30 Vol.% Ethylenglykol
- 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 5,4 + 30 Vol.% Methanol
- 0,01 M Natriumacetatpuffer pH 5,3 + 30 Vol.% DMSO

Gelmaterial : Q Sepharose® Fast Flow, Fa. Pharmacia

Arbeitstemperatur : - 10-12°C

1,0 g Perna I wurden bei - 10°C 60 min in den Puffern gerührt und zentrifugiert (4000 g, -10°C, 20 min). Zum Überstand wurden 20 g Q Sepharosegel gegeben und die Mischung mit einem Flügelrührer vier

Stunden gerührt. Nach einigen Waschvorgängen im Puffersystem wurde nacheinander mit 0,5 M KCl, 1 M KCl und 0,5 N NaOH eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden gegen demineralisiertes Wasser bei 8°C dialysiert und gefriergetrocknet.

3.2.8. Isolierung von Polysacchariden aus Muschelextrakt nach Papainabbau modifiziert nach CHAPLIN *et al.* 1986

10,0 g Muschelextrakt wurden zur Enzymhemmung mit einer Mischung von 1 mM Gluconolacton, 1mM Galaktonolacton (Fa. Sigma, München) und 1 mM N-Acetylglucosaminolacton versetzt und in 100 ml eines auf 80°C erwärmten 0,5 M Trispuffers (Zusatz von 20 mM EDTA, 20 mM Cystein HCl) pH 6,8 suspendiert. Die Mischung wurde 35 min bei 80°C unter Schütteln belassen. Nach Abkühlen auf 60°C wurden 20 mg Papain (Fa. Sigma) und nochmals die gleiche Menge Lactoninhibitoren zugegeben. Der Ansatz wurde unter Schütteln 24 Stunden bei 60-65°C inkubiert, wobei nach 15 Stunden nochmals 5 mg Papain zugesetzt wurden. Die Mischung wurde nach dem Abkühlen zentrifugiert (2800 g, 4°C, 20 min). Zu dem Überstand wurden unter Eiskühlung und Rühren 100 ml 15 % Trichloressigsäure langsam zugetropft. Nach einer Stunde wurde zentrifugiert und der Überstand mit 30 ml 4 N Natronlauge vorsichtig neutralisiert. Mit dieser Lösung wurden zwei Alkoholfällungen (1 + 4) hintereinander durchgeführt. Nach Dialyse und Gefriertrocknung wurde das Gemisch von Muschelpolysacchariden einer Anionenaustauschchromatographie an Q Sepharose® Fast Flow (Fa. Pharmacia) unterworfen.

3.2.9. Anionenaustauschchromatographie des Muschelextrakts Perna I nach Hitzedenaturierung

Säule : Q Sepharose® Fast Flow, Totalvolumen 160 ml

Puffer : 0,02 M Natriumphosphatpuffer pH 5,0 / 7,0

Gradient : 0 - 1,1 M NaCl, danach 0,5 N NaOH

Flow : 30 ml/h

Detektion : UV 206 nm, Refraktometer, Polarimeter

4,0 g Pernaextrakt I wurden in 30 ml heißen 0,02 M Natriumphosphatpuffer pH 5,0 suspendiert und unter Schütteln 35 min bei 80°C inkubiert. Die

abgekühlte Mischung wurde zentrifugiert (2800 g, 4°C, 20 min) und der Überstand von pH 5,8 auf pH 7,0 gebracht. Diese klare Lösung wurde in zwei Portionen auf eine Q Sepharose® Fast Flow - Anionenaustauschsäule gebracht und mit Phosphatpuffer, dem NaCl - Gradienten und 0,5 N NaOH nacheinander eluiert. Die erhaltenen Fraktionen (PeN1, PeN2, PeA1-3) wurden gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

3.2.10. Hydrolysebedingungen für Polysaccharide

1-2 mg Polysaccharid wurden in 5-20 ml Glasampullenfläschchen eingewogen und in 1-2 ml 2 N TFA gelöst. Nach dem Verschuß der Flasche wurde diese 90 min bei 121°C im Trockenschrank erhitzt.

3.2.11. Darstellung der Alditolacetate Nach BLAKENEY *et al.* 1983

Die hydrolysierte Polysaccharidlösung wurde mit 1 mg m-Inositol in 0,3 ml Wasser versetzt, in einen 25 ml Spitzkolben überführt und am Rotationsverdampfer bei 40°C zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde 2 x mit je 2 ml Methanol versetzt und wiederum eingeeengt. Der Rückstand wurde in 0,1 ml 1 M Ammoniak gelöst, mit 1 ml NaBH₄ - Lösung (2 % in DMSO) versetzt und 90 min bei 40°C im Wasserbad erhitzt. Überschüssiges NaBH₄ wurde mit 0,2 - 0,5 ml Eisessig zerstört (15 min). Die Acetylierung des reduzierten Zuckergemisches erfolgte durch Zugabe von 2 ml Essigsäureanhydrid und 0,2 ml 1 - Methylimidazol. Nach 15 min wurde überschüssiges Essigsäureanhydrid durch Zugabe von 20 ml eiskaltem Wasser hydrolysiert (15 min) und die Alditolacetate mit Dichlormethan (ca. 600 µl) ausgeschüttelt. Die Unterphase wurde direkt für die GC-Analyse verwendet (E.3.1.1.8.)

3.2.12. Acetylierung von Polysacchariden

3-10 mg Polysaccharid wurden in 0,4 ml Formamid gelöst, mit 0,2 ml Pyridin und 0,15 ml Acetanhydrid p.A. versetzt und 3 Stunden am Magnetrührer bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 10 ml

eiskaltes Wasser zugegeben und die ausgefallenen, acetylierten Polysaccharide abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde 2 x mit 1 ml H₂O dest. gewaschen und dann gefriergetrocknet.

3.2.13. Darstellung der methylierten Alditolacetate

Nach HAKOMORI 1964

Reagenzien :

Natrium-methylsulfinylmethanid (1,6 g NaH in 25 ml DMSO)

getrocknetes Dimethylsulfoxid

Methyliodid

Triphenylmethan

2 - 5 mg getrocknetes Polysaccharid (evtl. Polysaccharidacetat) wurden in einem 10-25 ml Injektionsfläschchen in 2-3 ml DMSO unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbads gelöst, wobei das Fläschchen vor dem Verschuß mit Stickstoff gesättigt wurde. Daraufhin wurden 1,5 ml Natrium-methylsulfinylmethanid über eine Injektionsnadel zur Lösung getropft. Der Ansatz wurde nach 30 min im Ultraschallbad über Nacht bei Raumtemperatur stengelassen. Unter starker Eiskühlung wurden tropfenweise 1,5 ml Methyliodid zugegeben. Nach 1 Stunde Ultraschallbad wurde überschüssiges Methyliodid am Rotationsverdampfer entfernt. Die Lösung wurde anschließend einen Tag gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und unter Vakuum zur Trockene eingeeengt.

Zur Darstellung der Alditolacetate wurde der Rückstand in 2 ml Ameisensäure 90 % aufgenommen und 1 Stunde im Wasserbad unter Rückfluß erhitzt. Die Ameisensäure wurde danach unter Vakuum abgezogen, der Rückstand in 2 ml 2 N TFA gelöst und 3 Stunden auf dem Dampfbad unter Rückflußkühlung erhitzt. Anschließend wurde die TFA am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand 2 x mit je 2 ml Methanol nachgewaschen.

Weitere Derivatisierung zu den partiell methylierten Alditolacetaten :

Die Hydrolyseprodukte wurden in 5 ml H₂O dest. aufgenommen, die Lösung mit einer Spatelspitze NaBH₄ (bzw. NaBD₄) bis zur alkalischen Reaktion versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Überschüssiges NaBH₄ wurde anschließend durch Zugabe von ca. 2 ml Eisessig zerstört und die Lösung im Vakuum zur Trockene eingeeengt. Zur Entfernung des Borates wurde das Reaktionsgemisch 2 x mit 3 ml MeOH

und 2 ml Essigsäure versetzt und jedes Mal zur Trockene eingeeengt. Zum Rückstand wurde danach 1 ml einer Mischung aus Essigsäureanhydrid und Pyridin (1+1) gegeben und die Lösung eine Stunde am Dampfbad erhitzt. Nach der Acetylierung wurde das Gemisch mehrmals mit Toluol versetzt und die Lösung zur Trockene eingeeengt, schließlich in 3,0 ml DCM aufgenommen und 3 x mit 3 ml H₂O dest. ausgeschüttelt. Nach Entfernung des DCM am Rotationsverdampfer wurden die Alditolacetate in 20 µl DCM aufgenommen und über GC und GC/MS - Analyse identifiziert. (E.3.1.1.9.)

3.2.14. Darstellung von N-Acetylglucosaminonolacton nach FINDLAY *et al.* 1958

6,0 g D-Glucosaminsäure (Fa. Sigma) wurden in 50,0 ml 10 % Natronlauge gelöst und mit 16,0 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Die Mischung wurde gerührt und nach 15 min mit verdünnter Schwefelsäure auf pH 2 - 3 eingestellt. Danach wurde die wässrige Lösung am Vakuum abgezogen und durch Waschen mit Ethanol letzte Spuren von Wasser entfernt. Der harzige Rückstand wurde 1 Stunde bei 100°C im Vakuumtrockenschrank erhitzt. Es schloß sich eine zweimalige Extraktion mit insgesamt 500 ml heißem Ethanol an. Der Ethanol wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Darauf folgte eine weitere Extraktion dieses Rückstandes mit 150 ml heißem Ethanol. Die Ethanolphase wurde mit Kohle behandelt, filtriert und bei 30°C am Rotationsverdampfer abgezogen. Der verbleibende Rückstand wurde 24 Stunden im Vakuumtrockenschrank bei 40°C erwärmt und unter Vakuum aufbewahrt. Die Ausbeute an weißem, pulverförmigem 2-Acetamido-2-desoxy-gluconolacton betrug 5,9 g. Eine Überprüfung der Identität fand über ¹H-NMR-Spektren statt. Enzymatisch wurde die Substanz in verschiedenen Konzentrationen auf ihre Hemmwirkung gegenüber N-Acetylglucosaminidase-Aktivität getestet.

4. Enzymatische Methoden

4.1. Bestimmung der glykohydrolytischen Aktivität

4.1.1. Spektrophotometrische Bestimmungen

4.1.1.1. Material und Geräte :

- Shimadzu Spektrophotometer UV-120-01
- Uvikon 810 Spektrophotometer, Kontron Instruments, Zürich

Substrate : alle Fa. Sigma, München

- p-Nitrophenyl- α -L-fucopyranosid, p-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid,
- p-Nitrophenyl- β -D-xylopyranosid, p-Nitrophenyl- α -L-arabinopyranosid,
- p-Nitrophenyl- β -D-mannopyranosid, p-Nitrophenyl- β -D-cellobiosid,
- p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid, p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-
- galaktosaminid, p-Nitrophenyl- β -D-glucuronid, p-Nitrophenyl- β -D-
- galakturonid, p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid (Fa. Serva, Heidelberg)

Verwendete Puffer :

- 0,1 M Natriumcitratpuffer pH 3,7
- 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 5,0
- 0,15 M NaCl + 0,01 M NaH_2PO_4 pH 6,5 (PBS)

Zusatz von Rinderserumalbumin 0,1 mg/ml (BSA)

- 0,5 M Natriumboratpuffer pH 10,0

Enzymkonzentration :

Muschelextrakte : Perna I, Perna II, Miesmuschel, Auster

12,5 mg lyophilisiertes Muschelpulver / 25 μ l Aqua dest.

2,0 g lyophilisierter, entfetteter Muschelextrakt (E.3.2.1) wurden in 50,0 ml Aqua dest. suspendiert und bei 4°C 60 min gerührt. Nach dem Abzentrifugieren (2800 g, 4°C, 10 min) wurde der Überstand vorsichtig bei 30°C am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und in 4,00 ml Aqua dest. aufgenommen (= Enzymlösung).

4.1.1.2. Methodik :

Der Inkubationsansatz bestand aus 175 μ l Puffer, in dem 0,1 mg/ml BSA gelöst worden waren, 25 μ l Enzymlösung und 50 μ l Substratlösung (0,5-5 mg/ml) in Puffer. Nach einer Inkubationsdauer von 10 - 60 min bei 30°C wurden 500 μ l Boratpuffer pH 10,0 hinzugefügt und die Lösung nach Abkühlen und Schütteln zentrifugiert (2800 g, 4°C, 5 min).

Die Bestimmung der verschiedenen Glykohydrolaseaktivitäten wurde nach der oben angegebenen Methode mit den korrespondierenden p-Nitrophenyl-Derivaten durchgeführt.

Abweichend davon wurden die α -L-Fucosidase- bzw. β -D-Galaktosidase-Aktivität mit einem Inkubationsansatz von 350 μ l Puffer, 25 μ l Enzymlösung, 100 μ l Substratlösung und 1,0 ml Boratpuffer bestimmt.

Bestimmung der N-Acetyl- β -D-glucosaminidase-Aktivität (Aufnahme eines kontinuierlichen Spektrums) : 675 μ l Puffer, 25 μ l Enzymlösung, 50 μ l Substratlösung, die Reaktion lief in einer auf 30°C thermostatisierten Küvette ab (Chart speed 1,0 cm/min; Rec Scale 0,5).

Die Bestimmung der β -D-Cellulase-Aktivität erfolgte bei einer Inkubationstemperatur von 37°C

4.1.1.3. Auswertung :

Die Extinktion des freigesetzten p-Nitrophenol wurde bei 405 nm gegen Blindwerte der Enzymlösung und der Substratlösung gemessen.

$$\epsilon_{\text{p-Nitrophenol}} = 18,8 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Berechnung der Enzymaktivität in kat, der spezifischen Enzymaktivität in kat/mg Protein und der rel.spezif.Enzymaktivität in %, bezogen auf Perna l.

4.1.2. Qualitativer Nachweis der Cellulase-Aktivität mit Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie siehe E.3.1.2.1.

Puffer : 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 5,0

Substrat : 32,5 mg Cellobiose / ml Puffer

In 750 μ l Puffer wurden 50 μ l Enzymlösung 5 min bei 37°C vorinkubiert. Danach wurden 200 μ l Substrat der Reaktionslösung zugesetzt und unter Schütteln 120 min bei 37°C inkubiert. Der Inkubationsansatz wurde auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und wie beschrieben entwickelt. Als Referenzen dienten Cellulase (Onozuka R-10 von Trichoderma viridis, 1,5 U/mg, Fa. Serva, Heidelberg), Glucose 1 mg/ml, Cellobiose 32,5 mg/ml und Cellulase mit 10^{-2} M Gluconolactonzusatz, die alle denselben Inkubationsbedingungen unterworfen worden waren.

4.2. Überprüfung der sulfatabspaltenden Aktivität

Substrat : p-Nitrophenyl-sulfat (Fa. Sigma)

Puffer : 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 5,0, 0,1 M Natriumcitratpuffer pH 3,7

Enzymlösung : 25 µl (siehe E.4.1.1.1.)

Methodik : 175 µl Puffer wurden mit 25 µl Enzymlösung vorinkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl Substratlösung verschiedener Konzentration (2-4 mg/ml) wurde 20 min bei 25°C inkubiert und alle 2 min ein Inkubationsansatz mit 500 µl 0,5 M Natriumborat pH 10,0 abgestoppt. Unter gleichen Bedingungen wurde eine Substratkontrolle durchgeführt. Die Auswertung erfolgte spektrophotometrisch analog E.4.1.1.3.

4.3. Überprüfung der proteolytischen Aktivität

4.3.1. Unspezifischer Proteasennachweis mit Azocoll®

Substrat : Azocoll® (100-250 mesh, Fa. Calbiochem, Frankfurt) 20 mg/ml

Puffer : 0,1 M Phosphatpuffer pH 5,3

Enzymlösung (siehe E.4.1.1.1.)

Referenzenzym : Pronase aus *Streptomyces griseus* (7000 PUK/g, Fa. Boehringer, Mannheim)

Methodik :

Zu 300 µl Puffer und 200 µl Enzymlösung wurden 250 µl homogen durchmischte Azocoll® Suspension pipettiert und unter Schütteln bei 37°C 60 min inkubiert. Alle 10 min wurde ein Ansatz im Eisbad 2 min lang abgestoppt, zentrifugiert (2800 g, 4°C, 3 min) und spektrophotometrisch bei 520 nm ausgewertet. Von dieser Extinktion wurden die Blindwerte der gleich behandelten Enzymlösung und der Azocoll® Suspension abgezogen. Die Referenzextinktion für Pronase lag bei 1,44 in einer Konzentration von 0,002 PUK und 30 min Inkubationsdauer.

4.3.2. Bestimmung der Trypsin-Aktivität nach BERGMAYER 1986

Substrat : N-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid (L-BAPNA HCl, Fa. Sigma, Taufkirchen) 0,6 mM im Test

Puffer : 0,2 M Triethanolamin Puffer (Ca^{++} 20 mM, pH 7,8)

Enzyme : Enzymlösung nach E.4.1.1.1.

Trypsin (2000 E/g, Fa. Merck) 80 µg/ml 0,001 N HCl

Inhibitor: Ovomucoid (24 U/mg, Fa. Serva, Heidelberg) 160 µg/ml Puffer

Methodik :

750 μl Puffer und 50 μl Enzymlösung wurden bei Raumtemperatur 5 min gemischt und nach Zugabe von 200 μl Substratlösung sofort in einer thermostatisierten Küvette bei 25°C kontinuierlich ausgewertet. Bei 405 nm wurde über einen Zeitraum von 10 min ein Spektrum aufgezeichnet. Bei Zusatz des Inhibitors wurden 50 μl der Ovomucoidlösung an Stelle von Puffer 5 min vor der Substratgabe zugefügt.

Auswertung :

Die Extinktion des freigesetzten p-Nitroanilins wurde bei 405 nm gegen Substrat- und Enzymblindwerte gemessen.

Chart speed : 1 cm/min Rec scale 0,5

$\epsilon_{\text{p-Nitroanilin}} = 1,02 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$

Berechnung der Enzymaktivität in kat, der spezifischen Enzymaktivität in kat/mg Protein und der rel.spezif.Enzymaktivität in %, bezogen auf Perna l.

4.3.3. Bestimmung der Papain-Aktivität

Testbedingungen siehe E.4.3.2. mit folgenden Änderungen:

Puffer : 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 6,2 mit Zusatz von 2,6 mM L-Cystein HCl (Fa. Sigma) und 0,52 mM EDTA

Enzyme: Papain aus Papaya Latex (Typ IV, 10-20 U/mg Protein, Fa. Sigma) 1 mg/ml.

F. Literatur

- ALBANO R. M., MOURAO P.A.S., J.of Biol.Chem. **261**, 758-765 (1986)
- ALLEN R.C., in "Biolumineszenz and Chemilumineszenz : Basic Chemistry and Analyt.Applications", Eds.: De Luca and McElroy, pp.63-73, Academic Press, New York 1981
- ANTES U., HEINZ H.-P., SCHULTZ D., BRACKERTZ D., LOOS M., Complement **5**, 205 (1988)
- ARITA H., TSUZUKI H., MORIHARA K., KAWANAMI J., J.Biochem.(Tokyo) **76**, 861-869 (1974)
- ARNON R., in : "Methods in Enzymology", Bd.XIX, Eds.: S.P.Colowick, N.O.Kaplan, Academic Press New York 1970
- ARROYAVA C.M., TAN E.M., Clin.Exp.Immunol. **29**, 89-94 (1977)
- ASGHAR S.S., Pharmacological Reviews **36**, 223-244 (1984)
- ASGHAR S.S., DE KOSTER A., VAN DER HELM H.J., Biol.Pharmacology **35**, 2917-2921 (1986)
- AUSTEN K.F., Transplantation Proc. **6**, 40 (1974)
- BAENKLER H.W., Euromed **10**, 648-649 (1981)
- BAICI A., SALGAM P., FEHR K., BÖNI A., Biochem.Pharmacol. **29**, 1723 (1980)
- BAKER B.R., ERICKSON E.H., J.Med.Chem.**12**, 408-419 (1969)
- BAKER J.T., WELLS R.J., In : "Natural Products as Medicinal Agents", pp. 281-318, Ed. J.L.Beal, E. Reinhard, Hippokrates Verlag Stuttgart 1981
- BAKER K.C., NICKLIN S., MILLER K., Fd.Chem.Toxic. **24**, 891-895 (1986)
- BARMANN T.E., Enzyme Handbook Vol. I, II, Suppl., Springer Verlag Berlin 1969
- BARRETT A.J., in : "Methods in Enzymology", Vol.**80**, 581-584 (1981)
- BAUER R., KHAN I.A., LOTTER H., WAGNER H., Helv.Chim.Acta **68**, 2355-2358 (1985)
- BAUER R., persönliche Mitteilung 1986
- BECKER B., Dissertation Med. Fakultät I der Universität Köln 1980
- BERGMAYER H.U., "Methods of Enzymatic Analysis", Vol.II, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 3d.Ed. 1986
- BEUSCHER H.U., BRADE V., Immunobiol. **173**, 41-55 (1986)
- BIOZZI G., BENACERRAF B., HALPERN B.N., Brit.J.Exp.Pathol. **34**, 441 (1953)
- BITTER T., MUIR H.M., Analyt.Biochem.**4**, 330-334 (1962)
- BITTER-SUERMAN D., BURGER R., HADDING U., Eur.J.Immunol.**11**, 291-295 (1981)
- BJÖRNDAL H., HELLERQUIST C.G., LINDBERG B., SVENSSON S., Angew. Chem.**82**, 643 (1970)

- BLAKENEY A.B., HARRIS P.J., HENRY R.J., STONE B.A., *Carbohydr.Res.* **113**, 291-299 (1983)
- BOCK K., PEDERSEN CH., *Adv.in Carbohydr.Chemistry*, Vol.41, pp. 27-44, Academic Press, New York 1983
- BOKISCH V.A., TOP F.H., RUSSEL P.R., DIXON F.J., MÜLLER-EBERHARD H.J., *N.Engl.J.Med.* **285**, 996-1000 (1973)
- BOYLE M.D.P., LANGONE J.J., BORSOS T., *Immunochemistry* **15**, 465-470 (1978)
- BRANDT L., *Scand.J.Hämatol.Suppl.* **2** (1967)
- BRAUN M., CAPORICCIO B., VENDRELL J.-P., VIGNAUD M., CHALET M., CODO-MIER L., *C.R.Soc.Biol.* **177**, 646-652 (1983)
- BRETTING H., RENWRANTZ L., *Z.Immun.-Forsch.* **145**, 242-249 (1973)
- BUEDING E., ORRELL S.A., *The Journal of Biological Chemistry* **236**, 2854-2857 (1961)
- CAUGHEY D.E., GRIGOR R.R., CAUGHEY E.B., YOUNG P., GOW P.J., STEWART A.W., *Eur.J.Rheum.Inflam.* **6**, 197-200 (1983)
- CHAPLIN M.F., KENNEDY J.F., "Carbohydrate Analysis" pp. 135, IRL Press, Oxford 1986
- CONCHIE J., HAY A.J., STRACHAN I., LEVY G.A., *Biochem.J.* **102**, 929-941 (1967)
- CONCHIE J., GELMAN A.L., LEVY G.A., *Biochem.J.* **106**, 135-140 (1968)
- COOMBE D.R., PARISH C.R., RAMSHAW I.A., SNOWDEN J.M., *Int.J.Cancer* **39**, 82-88 (1987)
- COOPER N. R., NEMEROW G.R., MAYES J.T., "Complement", Ed. H.J.Müller-Eberhard Springer Verlag, Berlin 1984
- COOPER N.R., *Fed.Proceed.* **42**, 134-138 (1983)
- COOPER T.G., "Biochemische Arbeitsmethoden", pp.350, W.de Gruyter Verlag Berlin 1981
- COUCH R.A.F., ORMROD D.J., MILLER T.E., WATKINS W.B., *NZ Med.J.* **95**, 803-806 (1982)
- CZOP J.K., "Advances in Immunology" **38**, 384-386, Ed. F.J.Dixon, Academic Press INC. 1986
- DANISHEFSKY I., in : "Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol.V, pp.407, Ed.: R.L. Whistler, Academic Press, New York 1965
- DIERICH M.P., ERDEI A., HUEMER H., PETZER A., STAUDER R., SCHULZ T.F., GERGELEY J., *Immunology Letters* **14**, 235-242 (1986)
- DI ROSA M., GIROUD J.P., WILLOUGHBY D.A., *J.Path.* **104**, 15-28 (1971)
- DOUZOU P., *Tibs*, N 205-207 (1979)
- DUTTON R.W., EADY J.D., *Immunology* **7**, 40 (1964)

- ELIAS H.-G., "Ultrazentrifugenmethoden", 3.Auflage, Beckman Instruments GmbH München 1969
- ENGLBERGER W., HADDING U., ETSCHENBERG E., GRAF E., LEYCK S., WINKEL-MANN J., PARNHAM M.J., *Int.J.Immunopharmacol.* **10**, 729-738 (1988)
- FAHN W., Dissertation Universität München 1988
- FESSLER B., Dissertation Universität München 1988
- FINDLAY J., LEVY G.A., MARSH C.A., *Biochem.J.* **69**, 467-476 (1958)
- FINK A.L., GOOD N., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **58**, 126 (1974)
- FINK A.L., ANGELIDES K.J., *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **64**, 701 (1975)
- FINK A.L., GEEVES M.A., in : "Methods of Enzymology", Vol.63, pp.336, Eds.: S.P.Colowick, N.O.Kaplan, Academic Press New York 1979
- FUHRMANN U., BAUSE E., PLOEGH H., *Biochimica et Biophysica Acta* **825**, 95-110 (1985)
- FUJII S., AOYAMA T., *Drugs of the Future* **9**, 849-856 (1984)
- FURUTA T., FUKUYAMA Y., ASAKAWA Y., *Phytochemistry* **25**, 517-520 (1986)
- GAO Q.-P., KIYOHARA H., CYONG J.-C., YAMADA H., *Planta Medica* **55**, 9-12 (1989)
- GARVEY J., CREMER N., SUSSDORF D., "Methods in Immunology", Ed.3, 379-409, W.A.Benjamin, Reading USA 1977
- GEDDES R., "The Polysaccharides", Vol.3, pp. 284-330, Ed.: G.O. Aspinall, Academic Press, New York 1985
- GEE A.P., "Methods in Immunology" Vol.93, 339-420, Ed. J.L.Langome, H.von Vunakis, Academic Press New York 1983
- GIBSON R.G., GIBSON S.L.M., CONWAY V., CHAPPELL D., *The Practitioner* **224**, 955-960 (1980)
- GICLAS P.C., *The Journal of Immunology* **129**, 168-172 (1982)
- GIROUD J.P., TIMSIT J., *Therapie* **28**, 889-905 (1973)
- GLOVSKY M.M., BECKER E.L., HALBROOK N.J., *The Journal of Immunology* **100**, 979-990 (1968)
- GÖTTING K.-J., "Malakozoologie", *Grundriß der Weichtierkunde*, pp.174-205, Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1974
- GRANATH K.A., KVIST B.E., *J.Chromat.* **28**, 69 (1967)
- GRESSNER A.M., *Klinikum der Philipps-Universität Marburg*, persönliche Mitteilung 1987
- HADDING U., *Medizin in unserer Zeit* **1**, 23-32 (1980)
- HAKOMORI S., *J.Biochem.(Tokyo)* **55**, 205-208 (1964)
- HAMPP N., Dissertation Universität München 1986
- HARA C., KIHIO T., TANAKA Y., UKAI S., *Carbohydr.Res.* **110**, 77-87 (1982)
- HEINZ H.P., HITSCHOLD T., LATSCH M., LOOS M., *Lab.Med.* **9**, 320-323 (1985)

- HICKMAN R.W., ILLINGWORTH J., *Marine Biology* **60**, 27-38 (1980)
- HÖCHST, *Kurzmitteilung in Scrip* **1322**, pp. 22 (1988)
- HÖRGER I., *Therapiewoche* **33**, 3948-3957 (1983)
- HONG K., KINOSHITA T., MIYAZAKI W., IZAWA T., INOUE K., *The Journal of Immunology* **122**, 2418-2423 (1979)
- HUI BON HOA G., DOUZOU P., *The Journal of Biological Chemistry* **248**, 4649-4654 (1973)
- HUNT S., "Polysaccharid-Protein Complexes in Invertebrates", Academic Press, London 1970
- IKUZAWA M., MATSUNAGA K., NISHIYAMA S., NAKAJIMA S., KOBAYASHI Y., ANDOH T., KOBAYASHI A., OHHARA M., OHMURA Y., WADA T., YOSHIKUMI C., *Int.J.Immunopharmac.* **10**, 415-423 (1988)
- ISHIOKA T., KUWABARA N., OOHASHI Y., WAKABAYASHI K., *CRC Critical Reviews in Toxicology* **17**, 215-244 (1987)
- ISHIZAKA S., HASUMA T., OTANI S., MORISAWA S., *J.Immunol.* **125**, 2232 (1980)
- ISSEKUTZ A.C., *J.of Immunological Methods* **61**, 275-281 (1983)
- JANSSON P.E., KENNE L., LIEDEGREN H., LINDBERG B., LÖNNGREN J., *J.Chem. Commun.* **8**, Univ.Stockholm 1976
- JEPSEN H.H., EKRE H.-P.T., SVEHAG S.-E., *Int.J.Immunopharmac.* **9**, 587-595 (1987)
- JORDAN E., WAGNER H., *Oncology* **43**, 8-15 (1986)
- KABAT E.A., MAYER M.M., "Kabat and Mayer's Experimental Immunochemistry", Ed.2, 133-239, Publ.Ch.C.Thomas, Springfield USA 1961
- KAHN M.-F., KAZATCHKINE M., *La Presse Médicale* **16**, 378-382 (1987)
- KAKAC B., VEJDELEK Z.J., in : "Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen", Bd.II, Verlag Chemie, Weinheim 1974
- KANEKO I., FEARON D.T., AUSTEN K.F., *The Journal of Immunology* **124**, 1194-1198 (1980)
- KATO M., TAKEDA T., OGIHARA Y., SHIMIZU M., NOMURA T., TOMITA Y., *Chem.Pharm.Bull.* **33**, 3675-3680 (1985)
- KIHO T., SAKAI M., UKAI S., HARA C., TANAKA Y., *Carbohydr.Res.* **142**, 344-351 (1985)
- KJÖLBERG O., MANNERS D.J., WRIGHT A., *Comp.Biochem.Physiol.* **8**, 353-365 (1963)
- KLOAREG B., DEMARTY M., MABEAU S., *Int.J.Biol.Macromol.* **8**, 380-386 (1986)
- KOSSOROTOW A., OPITZ W., ETSCHENBERG E., HADDING U., *Biochem.J.* **167**, 377-382 (1977)
- KOSUGE T., SUGIYAMA K., *International Patent WO 85/05033, Appl.Nr. PCT-AU85/00091*, 1985

- KOSUGE T., TSUJI K., ISHIDA H., YAMAGUCHI T., *Chem.Pharm.Bull.* **34**, 4825-4828 (1986)
- KRUZE D., FEHR K., MENNINGER H., BONI A., *Z.Rheumatol.* **35**, 337-346 (1976)
- LAW S.K.A., REID K.B.M., "Complement", IRL Press Oxford 1988
- LEHNINGER A.L., "Biochemie", 2.Auflage, Verlag Chemie, Weinheim 1977
- LOOS M., VOLANAKIS J.E., STROUD R.M., *Immunochemistry* **13**, 789-791 (1976)
- LOOS M., *Ann.Immunol.(Inst.Pasteur)* **133 C**, 165-179 (1982)
- LORAND L., in : "Methods in Enzymology", Vol.**45**, 31-37 (1976)
- LOWRY O.H., *J.Biol.Chem.***193**, 265-275 (1951)
- MATTENHEIMER H., "Die Theorie des enzymatischen Tests", Boehringer Mannheim GmbH 1986
- MAUFF G., persönliche Mitteilung 1988
- MAUREL P., HUI BON HOA G., DOUZOU P., *The Journal of Biological Chemistry* **250**, 1376-1382 (1975)
- MAUZAC M., MAILLET F., JOSEFONVICZ J., KAZATCHKINE M.D., *Biomaterials* **6**, 61-63 (1985)
- MILLER T.E., ORMROD D.O., *NZ Med.J.* **92**, 187-193 (1980)
- MILLER T. E., WU H., *NZ Med.J.* **97**, 355-357 (1984)
- MIZUMOTO K., SUGAWARA I., ITO W., KODAMA T., HAYAMI M., MORI S., *Japan.J.Exp.Med.***58**, 145-151 (1988)
- MORGAN E.L., *Complement* **3**, 128-136 (1986)
- MOURAO P.A.S., PERLIN A.S., *Eur.J.Biochem.* **166**, 431-436 (1987)
- MÜLLER-EBERHARD H.J., *Tempo Medical* **6**, 31-41 (1978)
- MÜLLER-PEDDINGHAUS R., ERDTMANN K., *Meth.and Find.Exptl.Clin.Pharmacol.***6**, 287-292 (1984)
- NAGUMO T., DOBASHI K., NISHINO T., FUJIHARA M., XIV th Int. Carbohydrate Symposium, August 14-19, Stockholm, Schweden 1988
- NAIR V.G., JOSEPH J.P., BERNSTEIN S., U.S.US 4,357,326 (Patent), 1982
- NICOL J.A.C., "The Biology of Marine Animals", pp. 28, Sir Isaac Pitman and Sons, London 1960
- NISHINO T., KIOHARA H., YOKOYAMA G., DOBASHI K., FUJIHARA M., YAMADA H., NAGUMO T., XIV th Int. Carbohydrate Symposium, August 14-19, Stockholm, Schweden 1988
- O'NEILL M.A., SELVENDRAN R.R., *Carbohydr.Res.* **111**, 239 (1983)
- OBAYASHI T., TAMURA H., TANAKA S., OHKI M., TAKAHASHI S., KAWAI T., *Infection and Immunity* **53**, 294-297 (1986)
- OFOU F.A., MODI G.J., BLAJCHMAN M.A., BUCHANAN M.R., JOHNSON E.A., *Biochem.J.***248**, 889-896 (1987)

- OHKAWA T., OHKAWA R., OHKAWA K., XIVth International Carbohydrate Symposium, August 14-19, 1988 Stockholm, Sweden
- OKUDA T., YOSHIOKA Y., IKEKAWA T., CHIHARA G., NISHIOKA K., *Nature New Biology* **238**, 59-60 (1972)
- OSHIMA Y., TAKATA S., HIKINO H., DEYAMA T., KINOSHITA G., *J.of Ethnopharmacology* **23**, 159-164 (1988)
- PALACIOS R., SUGAWARA I., FERNANDEZ C., *J.Immunol.* **128**, 621 (1982)
- PANGBURN M.K., *Fed.Proceed.* **42**, 139-143 (1983)
- PARDHY R.S., BHATTACHARYYA S.C., *Indian J. of Chemistry* **16b**, 176-178 (1978)
- PATRICK R.A., JOHNSON R.E., In *Annual Reports in Medical Chemistry* **15**, Ed. H.J.Hess and D.M.Baily, pp.193-201, Academic Press New York 1980
- PERRICONE R., FONTANA L., DE CAROLIS C., CARINI C., *Clin. Exp.Immunol.* **70**, 500-507 (1987)
- PLATTS-MILLS T.A.E., ISHIZAKA K., *J.of Immunol.* **113**, 348-357 (1974)
- PSCHYREMBEL W., "Klinisches Wörterbuch", De Gruyter Verlag, Berlin, New York (1986)
- PUHLMANN J., Dissertation Universität München in Vorbereitung 1989
- RAINSFORD K. D., WHITEHOUSE M.W., *Drug Res.* **30** (II), 2128-2132 (1980)
- RAPP H.J., BORSOS T., "Molecular Basis of Complement Action", Appleton-Century-Crofts, New York 1970
- RENWRANTZ L., STAHLER A., *J.Comp.Physiol.* **149**, 535-546 (1983)
- RINGELMANN R., OPFERKUCH W., RÖLLINGHOFF M., LOOS M., *Z.med.Mikrobiol.u.Immunol.* **154**, 329-343 (1969)
- ROCHE-SILVA M., CAVALCANTI R.Q., REIS M.L., *Biochem.Pharmacol.* **18**, 1285-1295 (1969)
- ROSS G.D., CAIN J.A., MYONES B.L., NEWMAN S.L., LACHMANN P.J., *Complement* **4**, 61-74 (1987)
- ROTHER K., HADDING U., TILL G., "Komplement" Biochemie und Pathologie, Dr.D.Steinkopff Verlag, Darmstadt 1974
- RUFF M., GIFFORD G.E., in "Lymphokine Reports 2", pp.235, Academic Press, New York 1981
- SCHIFFERLI J.A., *Immunology Letters* **14**, 225-228 (1986)
- SCHULTZ D.R., ARNOLD P.I., *Mol.Immunol.* **19**, 1681-1689 (1982)
- SCHULZE B., BEYER H.K., *Drug Res.* **31**, 1067-1069 (1981)
- SCHWEINLE J.E., JOINER K.A., *ISI Atlas of Science:Immunology* 106-109 (1988)
- SCOPES R., in "Protein Purification", pp.213, Springer Verlag New York 1983
- SCOTT J.E., in "Methods of Biochemical Analysis", Vol.VIII, pp.145-195, Ed.:

D. Glick, Interscience Publishers, New York 1960

SHARMA M.L., KHAJURIA A., KAUL A., SINGH S., SINGH G.B., ATAL C.K., Agents and Actions **24**, 161-164 (1988)

SIM R.P., MALHOTRA V., DAY A.J., ERDEI A., Immunology Letters **14**, 183-190 (1986)

SIMÕES C.M.O., SCHENKEL E.P., BAUER L., LANGELOH A., J.of Ethnopharmacology **22**, 281-293 (1988)

SINGH G.B., ATAL C.K., Agents and Actions **18**, 407-412 (1986)

SÖLTER J., UHLENBRUCK G., Immun.Infect. **10**, 130-135 (1982)

SPIRO R.G., In : Methods in Enzymology **8**, 3-26, Eds. E.F.Neufeld, V.Ginsburg, Academic Press, New York 1966

STEFFEN C., ZEITLHOFFER J., MENZEL J., SMOLEN J., Z.Rheumatol. **38**, 264-278 (1979a)

STEFFEN C., MENZEL J., SMOLEN J., Acta Med. Austriaca **1**, 13-18 (1979b)

STEFFEN C., MENZEL J., Z.Rheumatol. **42**, 249-255 (1983)

STOJAN B., Z. Rheumatol. **42**, 175-177 (1983)

STRYER L., Science **162**, 526-533 (1968)

SUGAWARA I., ISHIZAKA S., Cell.Immunol. **74**, 162 (1982)

SUN T., STAGIAS J., Clin.Chem. **32**, 2170-2174 (1986)

SVEDBERG T., PEDERSEN K.O., "Die Ultrazentrifuge", Th.Steinkopff Verlag, Dresden und Leipzig 1940

SWEET D.P., SHAPIRO R.H., ALBERSHEIM P., Carbohydr.Res. **40**, 217-225 (1975)

TAKADA Y., ARIMOTO Y., MINEDA H., TAKADA A., Immunology **34**, 509-515 (1978)

TANAKA S., KITAMURA F., SUZUKI T., Complement **4**, 33-41 (1987)

TERHO T.T., HARTIALA K., Analytical Biochemistry **41**, 471-476 (1971)

THORN W., MUTTKE B., MEYER B., FLESSNER H., Funkt.Biol.Med. **3**, 222-233 (1984)

TIMSIT J., AMINOT A., LECHAT P., Arch.Int.Pharmacodyn. **245**, 166-176 (1980)

TRUSCHEIT E., FROMMER W., JUNGE B., MÜLLER L., SCHMIDT D.D., WINGENDER W., Angew.Chem. **93**, 738-755 (1981)

TUBARO A., DELLA LOGGIA R., BREU W., WILLER F., WAGNER H., Vortrag 2.Tagung der Gesellschaft für Phytotherapie e.V., Münster Okt. 1988

UHLENBRUCK G., STEINHAUSEN G., BALDO B.A., Comp.Biochem.Physiol. **56 B**, 329-333 (1977)

UHLENBRUCK G., KARDUCK D., PEARSON R., Comp.Biochem.Physiol. **63B**, 125-129 (1979)

UHLENBRUCK G., persönliche Mitteilung 1987

UKAI S., KIHIO T., HARA C., KURUMA I., TANAKA Y., J.Pharmacobiodyn. **6**, 983-990 (1983)

- USUI T., YAMAOKA N., MATSUDA K., TUZIMURA K., SUGIYAMA H., SETO S.,
J.Chem.Soc. Perkin I, 2425-2431 (1973)
- VALERO J.M.-C., FONRODONA F.J.B., JUANIN M.J.P., GARCIA V.V., FERNANDEZ
M.F.L., BORRASCA A.L., *Sangre* **27**, 337-348 (1982)
- VELVART M., FEHR K., BAICI A., SOMMERMEYER G., KNÖPFEL M., CANCER M.,
SALGAM P., BÖNI A., *Rheumatol.Int.* 1981
- VERSEY J.M.B., HOBBS J.R., HOLT P.J.L., *Ann. Rheum. Dis.* **32**, 557-564 (1973)
- VERWEIJ-VAN VUGHT A.M., APPELMELK B.J., GROENEVELD A.B., SPARRIUS M.,
THIJS L.G., MACLAREN D.M., *Agents and Actions* **22**, 288-294 (1987)
- VINEGAR R., TRUAX J.F., SELPH J.L., JOHNSTON P.R., VENABLE A.L., MCKENZIE
K.K., *Federation Proceedings* **46**, 118-126 (1987)
- VOGT W., *Tibs* **3**, 114-119 (1985)
- VOGT W., *Complement* **3**, 177-188 (1986)
- VON ZABERN I., NOLTE R., *Complement* **3**, 97-104 (1986)
- VORLAENDER K.-O., "Immunologie" G.Thieme Verlag Stuttgart, pp 73 (1983)
- WAGNER H., FLACHSBARTH H., VOGEL G., *Planta Medica* **41**, 244-252 (1981)
- WAGNER H., KNAUS U., JORDAN E., *Zeitschrift für Phytotherapie* **8**, 148-149 (1987)
- WAGNER H., JORDAN E., *Phytochemistry* **27**, 2511-2517 (1988a)
- WAGNER H., KREHER B., JURCIC K., *Arzneim.-Forsch.* **38**, 273-275 (1988b)
- WEIR D.M., *Agents and Actions* **15**, 2-11 (1984)
- WESTON R.J., *New Zealand Journal of Science* **26**, 15-20 (1983)
- WHALEY K., "Complement in Health and Disease", MTP Press Limited Lancaster 1986
- WIERER M., *Dissertation Universität München* 1988
- WILLER F., *Dissertation Universität München in Vorbereitung*
- WINTER C.A., in : "Non-steroidal Antiinflammatory Drugs", Eds.: S.Garattini,
M.N.G.Dukes, p.170, *Excerpta Medica*, Amsterdam
- XIAO-YU L., NOLTE R., VOGT W., *Immunobiol.* **164**, 110-117 (1983)
- YAGI A., TOKUBUCHI N., NOHARA T., NONAKA G., NISHIOKA I., KODA A.,
Chem.Pharm.Bull. **28**, 1432-1436 (1980)
- YAMADA H., KIOHARA H., CYONG J.-C., KOJIMA Y., KUMAZAWA Y., OTSUKA Y.,
Planta Medica, pp.163-167 (1984)
- YAMADA H., OHTANI K., KIOHARA H., CYONG J.-C., OTSUKA Y., UENO Y.,
OMURA S., *Planta Medica*, pp.121-125 (1985)
- YAMADA H., NAGAI T., CYONG J.-C., TOMODA M., SHIMIZU N., GONDA R.,
Carbohydr.Res. **156**, 137-145 (1986)
- YAMADA H., KIOHARA H., OTSUKA Y., *Carbohydr.Res.* **170**, 181-191 (1987a)
- YAMADA H., YANAHIRA S., KIOHARA H., CYONG J.-C., OTSUKA Y., *Phytochemi-
stry* **26**, 3269-3275 (1987b)

- YAMADA H., YOSHINO M., MATSUMOTO T., NAGAI T., Chem.Pharm.Bull. **35**, 4851-4855 (1987c)
- YAMADA H., RA K.-S., KIYOHARA H., CYONG J.-C., YANG H.C., OTSUKA Y., Phytochemistry **27**, 3163-3168 (1988)
- YAMASHITA T., ISHIBASHI Y., NAGAOKA I., KASUYA K., MASUDA K., WARABI H., SHIOKAWA Y., Inflammation **6**, 87-101 (1982)
- YOSHIDA O., NAKASHIMA H., YOSHIDA T., KANEKO Y., YAMAMOTO I., Biochem.-Pharmacology **37**, 2887-2981 (1988)
- ZWILLING R., "Immunologisches Praktikum", pp. 49-58, G. Fischer Verlag Stuttgart 1977

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

Ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. H. Wagner für sein großes Interesse an dieser Arbeit, ihre großzügige Förderung und das mir jederzeit entgegengebrachte Vertrauen danken.

Weiterhin möchte ich danken :

Herrn Prof. Dr. G. Mauff und seiner Mitarbeiterin Frau M. Braun, Hygiene-Institut der Universität Köln, für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung der Immunfixationsteste und die freundliche Aufnahme in ihrem Arbeitskreis.

Herrn Dr. H. Decker und Herrn F. Penz, Institut für Zoologie der Universität München, für die Ausführung der Ultrazentrifugen-Analysen und die Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums. Mein Dank gilt besonders Herrn Dr. H. Decker für seine wertvollen Anregungen und für seine große Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. A. Tubaro, Institut für Pharmakologie und Pharmakognosie der Universität Triest, für die engagierte Durchführung der in-vivo-Studien am Rattenpfotenödem und die nette Zusammenarbeit.

Frau R. Hunstein, Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Technischen Universität München, für die Einführung in die Ionenchromatographie und die freundliche Aufnahme am Institut.

Herrn Prof. Dr. K. Thoma und seinen Mitarbeiterinnen Frau Dr. A. Schmid und Frau M. Lauchert, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München, für die Messung von Diffusionskoeffizienten mit Laser-Light-Scattering.

Herrn Dr. R. Klauser, Luitpold-Werk München, für die freundliche Durchführung mehrerer Blutgerinnungstests.

Prof. Dr. med. G. Uhlenbruck, Institut für Immunbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Köln, für die Ausführung von Hämagglutinations- und Präzipitationsversuchen.

Herrn Prof. Dr. H. Fritz und Herrn Prof. Dr. E. Fink, Institut für Klinische Chemie und Biochemie an der Chirurgischen Klinik München, für die Durchführung eines Elastase-Hemmtests.

Herrn Dr. H. Schübel für die Aufnahme eines 90 MHz ^{13}C -NMR-Spektrums

Herrn Dr. O. Seligmann, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, für die Aufnahme der GC-MS Spektren.

Der Firma Hastar-Enterprises, Soest, Holland, für die Überlassung verschiedener Chargen von Perna-Muschelextrakten.

Der Firma Nattermann, Köln, für die einführenden Informationen und Hilfestellungen bei der Etablierung eines Klassischen Gesamtkomplement-Testsystems.

Herrn Dr. P. Wolff für seine hilfsbereite organisatorische Unterstützung.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen S. Vollmer, R. Mayer und I. Gügel für die engagierte und sorgfältige Assistenz bei der Durchführung pharmakologischer Untersuchungen. Dabei möchte ich mich besonders herzlich für die tatkräftige Mitarbeit von Frau S. Vollmer bei allen Komplementtestsystemen bedanken.

Mein spezieller Dank gilt den Freunden und Kollegen J. Puhlmann, Dr. E. Jordan, Dr. W. Fahn, Dr. R. Bauer und Dr. R. Samtleben, die durch ihre Diskussionsbereitschaft, ihre Anregungen und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich auch allen, die während dieser Arbeit immer für mich da waren.

LEBENS LAUF

Ulla, Gissi, Franziska K n a u s

geboren am 30. Dezember 1955 in Nürnberg

- Eltern : Dr. Walter Knaus, Dipl.Kaufmann
und Gisela Knaus, geb. Helbsing
- Schulausbildung : 1961-1965 Volksschule Lochham
1965-1974 Kurt Huber Gymnasium Gräfelfing
22. Juni 1974 Abitur
- Studium : 1974-1976 Georgia Augusta Universität Göttingen,
Studium der Landwirtschaft, 1. Vordiplom
1976 Universität Innsbruck, Österreich, Studium der
Kunstgeschichte
1976-1977 Schweizer Matura, abgelegt am 26.9.1977
1977-1983 Eidgenössische Technische Hochschule
Zürich, Schweiz, Studium der Pharmazie
Diplomprüfung am 6. Dezember 1983
- Pharmaziepraktikum : Mai 1979 - Nov. 1979 Kreiskrankenhaus Pasing -
München
Nov. 1979 - Okt. 1980 Züri-Apotheke, Zürich,
Schweiz
Schweizer. Assistentenexamen 23.10.1980
Jan. 1984 - Juli 1984 Hirschapotheke, Ulm
3. Abschnitt der Pharm. Prüfung 31. Juli 1984
- Approbation : 27. September 1984
- Berufsausübung : seit Oktober 1980 Apotheker-Assistentin (CH)
- Wissenschaftliche
Tätigkeit : November 1984 Beginn der vorliegenden Arbeit unter
Leitung von Prof. Dr. H. Wagner am Institut für
Pharmazeutische Biologie der Universität München

